

Математическое моделирование реутилизации гипоксантина

П.П. Золин¹, В.М. Лебедев², В.Д. Конвай¹

¹ – ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», Омск

² – ФГБОУ ВО «Финансовый университет при Правительстве Российской Федерации», Москва

Контактная информация: к.м.н. Золин Петр Петрович, zolin_petr@mail.ru

Целью настоящей работы являлась разработка математических моделей метаболизма гипоксантина *in vivo*: поступления гипоксантина в печень, его реутилизации, регуляции этого процесса мононуклеотидами и фосфорибозилпирофосфатом. Опыты выполнены на крысах-самцах, которых подвергали 6,5-минутной асфиксии с последующей реанимацией. Крыс подвергали эвтаназии через 30 мин, 6 и 24 ч, 3, 7 и 21 сут после реанимации и сравнивали с контрольными животными. По результатам математического моделирования сделан вывод, что активность гипоксантин/гуанинфосфорибозилтрансферазы в печени *in situ* регулируется доступностью фосфорибозилпирофосфата. Уровни мононуклеотидов не влияют *in situ* на вовлечение гипоксантина в процесс реутилизации (включение ¹⁴C-гипоксантина в нуклеозидмонофосфаты, нуклеозидди- и трифосфаты).

Ключевые слова: метаболизм пуринов, гипоксантин, реутилизация, математическое моделирование, фосфорибозилпирофосфат.

Введение

Усиление катаболизма пуриновых мононуклеотидов играет важную роль в развитии энергетического дефицита при многих патологических состояниях [1, 16, 19, 21], в т.ч. при постреанимационной болезни [4, 5, 24]. Важнейшим промежуточным продуктом распада пуриinnуклеотидов является гипоксантин. Он находится как бы “на перекрестке” метаболических путей пуринового обмена и считается центральным интермедиатом метаболизма пуринов [18]. Кроме того, известно, что клетки организма осуществляют “экспорт” и “импорт” пуринов, главным образом, в виде гипоксантина, для которого существуют специальные системы межтканевого и межорганного транспорта и прохождения через клеточную мембрану. По

образному выражению автора известной монографии о метаболизме пуринов Н.П. Дмитриенко, гипоксантин «... является основной «валютой» в пуриновом обмене организма» [1].

Противоположно направленным процессом по отношению к распаду пуриnnуклеотидов является реутилизация гипоксантина. Пуриnnуклеозидфосфорилазная реакция не играет существенной анаболической роли [16, 21], кроме того, в большинстве клеток млекопитающих отсутствует инозинкиназа [16, 19]. Поэтому гипоксантин реутизируется не через инозин, а сразу превращается в инозинмонофосфат в реакции с фосфорибозилпирофосфатом (ФРПФ), катализируемой гипоксантин/гуанинфосфорибозилтрансферазой (ГГФРТазой). Затем инозинмонофосфат

превращается в др. нуклеозидмонофосфаты (НМФ): аденилосукцинат, аденозинмонофосфат, ксантозинмонофосфат, гуанозинмонофосфат. НМФ, в свою очередь, могут фосфорилироваться до соответствующих нуклеозидди- и трифосфатов (НДТФ): аденозиндифосфата, аденозинтрифосфата, гуанозиндифосфата, гуанозинтрифосфата, инозиндифосфата, инозинтрифосфата и т.д.

Давно известно, что “узким местом” процесса превращения гипоксантина в НМФ и НДТФ является ГГФРТазная реакция [16, 23], однако до сих пор не решен вопрос о том, чем именно лимитируется протекание этой реакции *in vivo*. Выдвинуты два претендента на роль лимитирующего фактора: это концентрация ФРПФ либо активность ГГФРТазы, проявляющаяся в клетке *in situ*.

Первой точки зрения придерживаются авторы работ [3, 10, 19], полагающие, что скорость реутилизации гипоксантина в различных клетках лимитируется доступностью ФРПФ для ГГФРТазной реакции.

Сторонники второй точки зрения – авторы статьи [22] – считают, что интенсивность реутилизации гипоксантина в эритроцитах дельфинов определяется активностью ГГФРТазы. В очень детально описанной работе [23] было установлено, что если взять аденозинтрифосфат, гуанозинтрифосфат, инозинмонофосфат и гуанозинмонофосфат в физиологических для печени концентрациях, то каждый из них по отдельности обладает ингибирующим эффектом на ГГФРТазу, очищенную из крысиной печени. А вместе все четыре мононуклеотида, взятые в тех же физиологических концентрациях, ингибируют ГГФРТазу сильнее, чем каждый из них

по отдельности – а именно, на 95%, т.е. почти полностью; при этом для измерения активности фермента использовались физиологические концентрации гипоксантина и ФРПФ. Авторы этого исследования сделали вывод, что реутилизация гипоксантина *in vivo* регулируется вышеуказанными мононуклеотидами, поскольку оставшаяся небольшая активность фермента (5%) становится фактором, лимитирующим скорость реакции.

Однако в работе [23] ингибирование ГГФРТазы мононуклеотидами было продемонстрировано на очищенном ферменте в условиях *in vitro*, а как дело обстоит *in vivo* – остается неизвестным.

Кроме того, на реутилизацию гипоксантина в печени в условиях целостного организма может дополнительно влиять и поступление гипоксантина в данный орган из крови. Печень является главным органом пуринового обмена [3, 16, 23], в котором утилизируется не только собственный гипоксантин, но и поступающий с кровью из др. органов.

Изучать реутилизацию гипоксантина *in vivo* можно путем введения в организм меченого гипоксантина. Но в настоящее время отсутствуют адекватные биохимические методы, которые бы позволили количественно изучить в условиях *in situ*, как влияют на реутилизацию гипоксантина сочетания различных концентраций потенциальных веществ-регуляторов, а также вклад гипоксантина, поступающего в орган из крови. Сделать это можно путем математического моделирования, которое в данном случае не просто облегчает или удешевляет исследование, а позволяет получить уникальную информацию о регуляции метаболических процессов в условиях целостного организма, кото-

рую пока невозможно получить другими способами.

Целью настоящей работы явилось изучение при помощи математического моделирования направленности и силы влияний, которые оказывают на процессы реутилизации гипоксантина в печени мононуклеотиды, ФРПФ и интенсивность поступления в печень гипоксантина.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 116-ти нелинейных белых крысах-самцах, содержащихся в стандартных условиях вивария ЦНИЛ ОмГМУ и получавших стандартный лабораторный рацион при свободном доступе к воде и пище. Все опыты выполнены с учетом рекомендаций Европейской конвенции о гуманном обращении с лабораторными животными (European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimentation and other scientific purposes (ETS № 123, Strasbourg, 1986)). Показатели массы крыс перед опытом составляли: средняя арифметическая – 238 г, среднеквадратическое отклонение – 31 г, ошибка средней – 2,3 г.

Дизайн исследования включал применение плана параллельных групп и простой рандомизации. Крыс, находящихся под легким эфирным наркозом, фиксировали в положении на спине и интубировали полиэтиленовой трубкой диаметром 2 мм. После установления ритмичного дыхания трубку перекрывали на 6,5 мин, после чего животных реанимировали при помощи непрямого массажа сердца и искусственного дыхания. Формировали группы, в которых забирали печень через 30 мин, 6 и 24 ч, 3, 7 и 21 сут после начала реанимации.

Крыс группы “Контроль” подвергали не асфиксии и реанимации, а лишь контрольным манипуляциям – наркозу, фиксации, интубации. При забое животных и взятии биоматериала крыс наркотизировали диэтиловым эфиром, вскрывали у них брюшную полость, пересекали серповидную и дугообразную связки, соединяющие печень с диафрагмой, после чего погружали печень в жидкий азот до полного замораживания. Для исследования использовали краевые части печени, наиболее быстро замороженные. Всем животным за 25 мин до фиксации печени в жидком азоте вводили в бедренную вену ^{14}C -гипоксантин в дозе $740 \text{ кБк} \cdot \text{кг}^{-1}$, растворенный в 0,9%-ном NaCl, который брали из расчета $2,5 \text{ мл} \cdot \text{кг}^{-1}$ массы тела.

Приготовление хлорнокислого экстракта печени, определение его общей радиоактивности, содержаний НМФ, НДТФ и включения в них ^{14}C -гипоксантина выполняли, как описано ранее [4]. В отдельном кусочке печени определяли содержание ФРПФ по методу [7].

Математическое моделирование метаболизма гипоксантина проводили с помощью регрессионного анализа. Он является одним из наиболее востребованных количественных методов в различных науках – медико-биологических, технических, социальных и т.д. Сильная сторона метода состоит в том, что он направлен не просто на изучение изменений взаимосвязанных параметров, но на сведение в одной формуле причины и следствия. Регрессионный анализ отвечает на вопрос: «Влияет ли одна или несколько переменных (потенциальных причин) на другую переменную (результат) и, если да, то в какой мере?».

Уравнение многофакторной регрессии в общем виде можно записать следующим образом:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_m) + e \quad (1),$$

где зависимая переменная y , называемая откликом, является функцией от независимых переменных $x_1, x_2, \dots, x_m$, которые обычно именуются факторами; $f(x)$ – функция, описывающая силу и форму влияния $x_1, x_2, \dots, x_m$ на y ; e – случайная составляющая отклика, обычно она трактуется как совокупность всех неучтенных в модели и влияющих на y факторов и случайностей, в т.ч. ошибок измерения [2, 11, 13].

Аналитическое выражение функции отклика y , как правило, выбирают из следующего набора стандартных видов функций: прямая, парабола, гипербола, полином, экспоненциальная функция, логарифмическая функция. Полином или многочлен от m переменных – это сумма одночленов или, строго – конечная формальная сумма вида:

$$\sum_I c_I x_1^{i_1} x_2^{i_2} x_3^{i_3} \dots x_m^{i_m} \quad (2),$$

где: $I = (i_1, i_2, \dots, i_m)$ – набор из целых неотрицательных чисел, именуемый мультииндексом; c_I – число, именуемое коэффициентом полинома или многочлена, зависящее только от мультииндекса I .

Многофакторную регрессию в виде полинома можно записать следующим образом:

$$y = \sum_I c_I x_1^{i_1} x_2^{i_2} x_3^{i_3} \dots x_m^{i_m} + e \quad (3),$$

где $x_j, j = 1, \dots, m$ – факторы.

Линейным полиномом называют полином первой степени. Тогда уравнение (3) для линейной полиномиальной рег-

рессии можно записать в следующем виде:

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^m b_i x_i \quad (4),$$

где x_i – факторы; b_0, b_i – действительные константы (коэффициенты функции отклика); $i = \overline{1, m}$. Коэффициент b_0 называется свободным членом регрессионного уравнения.

Любая метаболическая система может быть охарактеризована большим числом различных параметров, среди которых исследователь должен: а) выделить (назначить) факторы и отклики; б) выбрать вид модели. На этом этапе работы важное значение имеет априорная информация, под которой понимается информация, полученная в предыдущих экспериментах или взятая из литературы [2, 8, 14]. Обе указанные задачи неформализуемы или ограниченно формализуемы, т.е. по преимуществу являются прерогативой человека, а не компьютерной программы. Выбор факторов и откликов определяется в основном не математическими, а содержательными соображениями, в нашем случае – биохимическими. А выбор вида зависимости отклика от факторов плохо формализуется потому, что одна и та же эмпирическая кривая на заданном участке определения может быть примерно с одинаковой точностью описана самыми разными аналитическими выражениями. Исследователь выбирает между ними, руководствуясь их разработанностью, удобством интерпретации, прошлым опытом и т.д.

Как отмечает А.И. Орлов [12], теория оценивания неизвестных параметров хорошо развита в случае линейного регрессионного анализа. Если же линейности нет и нельзя перейти к

линейной задаче, то, как правило, хороших свойств от оценок ожидать не приходится. С другой стороны, ожидается, что XXI век станет веком нелинейной математики, поскольку все линейные процессы изучены, а мы живем в мире, где преобладают нелинейные процессы [6].

Мы в настоящей работе использовали линейную регрессию по трем причинам. Во-первых, вполне логично начать с линейных моделей, а затем уже, если возникнет необходимость, переходить к более сложным нелинейным зависимостям отклика от факторов. Во-вторых, имеются априорные данные о близком к линейному влиянии на реутилизацию гипоксантина отдельных изучаемых нами факторов, взятых поодиночке [19, 23]. В-третьих, линейную модель, как правило, строят в тех случаях, когда объемы выборок n сравнительно невелики – в т.н. «отсеивающих экспериментах», когда требуется по ограниченному количеству опытов выбрать факторы, оказывающие наибольшее влияние на отклик [8], – это вполне соответствует характеру нашего исследования.

Как известно, даже простейшую линию – прямую – можно провести (на плоскости или в многомерном пространстве) разными способами. Нами для получения оценок коэффициентов функции (4) по экспериментальным данным использовался метод наименьших квадратов. Его широкая популярность объясняется двумя главными преимуществами: во-первых, применение метода наименьших квадратов не требует знания закона распределения обрабатываемых наблюдений, а, во-вторых, он хорошо разработан в плане вычисли-

тельной реализации [8, 12, 14]. Сущность метода заключается в нахождении таких параметров модели (коэффициентов уравнения регрессии), при которых минимизируется сумма квадратов отклонений экспериментальных значений отклика от значений отклика, вычисленных по модели.

Построение и исследование регрессионных моделей с помощью метода наименьших квадратов мы проводили, как описано в работе [5], с помощью созданной нами компьютерной программы “*RegMed*” (авторы: А.П. Мягчилов, В.М. Лебедев, П.П. Золин, государственная регистрация программы произведена во ВНИИЦ в 2009 г., регистрационный № 50200900439).

Одним из требований, предъявляемых к совокупности факторов для возможности применения метода наименьших квадратов, является независимость факторов друг от друга, которая понимается как отсутствие между ними линейной связи [2].

В тех случаях, когда наша модель содержала только два фактора, для проверки наличия связи между ними мы применяли в программе “*RegMed*” непараметрический парный коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Если же модель содержала более двух факторов, для проверки связи всей совокупности этих факторов в программе “*RegMed*” мы использовали непараметрический коэффициент конкордации (коэффициент согласованности) Кендалла [5].

Часто перед исследователем стоит задача сравнения силы влияния факторов на отклик. Но факторы в модели, как правило, выражены в различных единицах измерения, поэтому их сравнение

правомерно лишь в том случае, если их привести к безразмерному, стандартизованному виду. В настоящей работе применена стандартизация факторов и отклика по среднеквадратическому отклонению s . Обычно при использовании стандартизации по s все значения просто делят на s , мы же избрали модифицированную процедуру [14], в которой разница между эмпирическим значением отклика каждой крысы и средним арифметическим группы делится на s группы. Тогда в уравнении регрессии цифровые коэффициенты перед факторами показывают силу влияния факторов на отклик. При этом коэффициент b_0 в уравнении отсутствует. В стандартизованном таким способом масштабе за начало отсчета (нуль) для отклика и для каждого фактора принимается его средняя арифметическая в выборке, а за единицу измерения – величина s .

Минимально необходимым и в то же время важнейшим требованием, предъявляемым к модели, является адекватное описание ею изучаемого объекта. Лишь при условии, что модель достаточно адекватна, имеет смысл говорить о других ее достоинствах – интерпретируемости, простоте и т.д. Единого общего правила для анализа адекватности регрессионных моделей нет [13]. В нашей работе основным способом проверки адекватности моделей стала проверка при помощи коэффициента корреляции Спирмена [5]. В литературе имеются примеры его применения при оценке результатов регрессионного анализа [9, 11]. Программа “RegMed” содержит возможность проверки адекватности моделей при помощи коэффициента корреляции Спирмена, а также при

помощи F-критерия Фишера [5]. Но условием применимости последнего является нормальное распределение случайной составляющей отклика e [2, 8], что выполняется не всегда. Поэтому F-критерий Фишера для проверки адекватности моделей мы применяли выборочно.

Результаты и их обсуждение

В процессе построения и отбора многофакторных моделей нередко используют т.н. «пошаговый регрессионный анализ», сущность которого состоит в последовательном увеличении или уменьшении в регрессионной модели количества факторов [8, 13-15]. При этом в модели оставляют факторы, ориентируясь не только на статистические, но и на содержательные соображения. Мы построили и проверили на адекватность линейные регрессионные модели, включающие в себя все возможные комбинации четырех выбранных нами факторов: включения ^{14}C -гипоксантина в хлорнокислый экстракт печени, содержания в данном органе ФРПФ, НДТФ и НМФ. Использование в моделях содержания НДТФ и НМФ вместо отдельных концентраций аденозинтрифосфата, гуанозинтрифосфата, инозинмонофосфата, гуанозинмонофосфата и др. нуклеотидов позволило нам резко снизить число факторов в модели для того, чтобы превышение числа опытов (объема выборки) над числом факторов было достаточно большим. Заметим, что в статистике преобразование исходных факторов в новые, укрупненные факторы, является одним из способов устранения взаимосвязи (мультиколлинеарности) исходных факторов [14].

В настоящей работе исследовали влияние сочетаний четырех вышеуказанных факторов на два отклика: y_1 – включение ^{14}C -гипоксантина в НМФ и y_2 – включение ^{14}C -гипоксантина в НДТФ печени. Регрессионные модели со стандартизированными факторами и откликами y_1 и y_2 , выдержавшие проверку на адекватность, представлены в табл. 1 и 2. Наличие связи между всеми возможными

парами факторов проверяли в программе “RegMed” при помощи коэффициента парной корреляции Спирмена, а наличие связей совокупностей трех или четырех факторов проверяли с помощью коэффициента конкордации Кендалла. Статистически значимая связь факторов, обнаруженная по коэффициентам Спирмена или Кендалла, обозначена в табл. 1 и 2 пометкой «(связ.)».

Таблица 1
Регрессионные модели регуляции включения гипоксантина в НМФ

Группы крыс	Регрессионные модели (после стандартизации по среднему квадратическому отклонению)	PS
Контроль	$y_1 = 0,14*[\text{ФРПФ}] + 0,78*[^{14}\text{C}] - 0,06*[\text{НДТФ}] + 0,49*[\text{НМФ}]$	<0,025
	$y_1 = 0,30*[\text{ФРПФ}] + 0,57*[\text{НДТФ}] + 0,14*[\text{НМФ}]$	0,01
	$y_1 = 0,80*[^{14}\text{C}] - 0,14*[\text{НДТФ}] + 0,61*[\text{НМФ}]$	<0,025
	$y_1 = 0,38*[\text{ФРПФ}] + 0,66*[\text{НДТФ}]$	<0,025
	$y_1 = 0,05*[\text{ФРПФ}] + 0,62*[\text{НМФ}]$	0,05
	$y_1 = 0,42*[\text{НДТФ}] + 0,39*[\text{НМФ}]$	0,05
6 ч после реанимации	$y_1 = 0,70*[\text{ФРПФ}] + 0,90*[\text{НДТФ}] + 0,18*[\text{НМФ}]$	0,005
	$y_1 = 0,77*[^{14}\text{C}] + 1,28*[\text{НДТФ}] - 0,33*[\text{НМФ}]$	0,005
	$y_1 = 0,71*[\text{ФРПФ}] + 1,05*[\text{НДТФ}]$	0,05
3 сут после реанимации	$y_1 = 0,74*[^{14}\text{C}] + 0,04*[\text{НДТФ}] + 0,14*[\text{НМФ}]$ (связ.)	<0,05
	$y_1 = 0,53*[\text{НДТФ}] + 0,21*[\text{НМФ}]$	<0,025
7 сут после реанимации	$y_1 = 0,09*[\text{ФРПФ}] + 0,87*[^{14}\text{C}] + 0,44*[\text{НДТФ}] - 0,26*[\text{НМФ}]$	0,005
	$y_1 = 1,23*[\text{ФРПФ}] - 0,99*[\text{НДТФ}] + 0,84*[\text{НМФ}]$ (связ.)	<0,05
	$y_1 = 0,91*[^{14}\text{C}] + 0,54*[\text{НДТФ}] - 0,33*[\text{НМФ}]$	0,005
	$y_1 = 0,59*[\text{ФРПФ}] + 0,27*[\text{НМФ}]$	<0,05
21 сут после реанимации	$y_1 = 0,08*[\text{ФРПФ}] + 0,86*[^{14}\text{C}] + 1,32*[\text{НДТФ}] - 1,08*[\text{НМФ}]$	<0,01
	$y_1 = 0,84*[^{14}\text{C}] + 1,26*[\text{НДТФ}] - 1,02*[\text{НМФ}]$	<0,01

Примечания: отклик y_1 – включение ^{14}C -гипоксантина в НМФ печени; фактор [ФРПФ] – содержание ФРПФ в печени, фактор [^{14}C] – общее включение ^{14}C -гипоксантина в хлорнокислый экстракт печени, фактор [НДТФ] – содержание НДТФ в печени, фактор [НМФ] – содержание НМФ в печени; P_s – показатель адекватности моделей: статистическая значимость связи между экспериментальными и модельными значениями отклика y_1 по критерию Спирмена.

Таблица 2

Регрессионные модели регуляции включения гипоксантина в НДТФ

Группы крыс	Регрессионные модели (после стандартизации по среднему квадратическому отклонению)	P_s
Контроль	$y_2 = -1,20*[\text{ФРПФ}] + 0,59*[^{14}\text{C}] - 1,14*[\text{НДТФ}] + 1,42*[\text{НМФ}]$ $y_2 = -1,07*[\text{ФРПФ}] - 0,66*[\text{НДТФ}] + 1,16*[\text{НМФ}]$	<0,005 0,01
30 мин после реанимации	$y_2 = 0,38*[^{14}\text{C}] + 0,65*[\text{НДТФ}] + 0,44*[\text{НМФ}]$ $y_2 = 0,59*[\text{НДТФ}] + 0,52*[\text{НМФ}]$	0,01 <0,05
6 ч после реанимации	$y_2 = 0,35*[\text{ФРПФ}] - 1,16*[\text{НДТФ}] + 0,53*[\text{НМФ}]$ $y_2 = 0,39*[^{14}\text{C}] - 0,96*[\text{НДТФ}] + 0,26*[\text{НМФ}]$ $y_2 = 0,37*[\text{ФРПФ}] - 0,72*[\text{НДТФ}]$ $y_2 = -1,33*[\text{НДТФ}] + 0,57*[\text{НМФ}]$	0,005 0,005 0,05 0,05
24 ч после реанимации	$y_2 = 0,80*[\text{НДТФ}] - 0,02*[\text{НМФ}]$	0,05
3 сут после реанимации	$y_2 = 0,76*[^{14}\text{C}] + 0,002*[\text{НДТФ}] + 0,13*[\text{НМФ}]$ (связ.) $y_2 = 0,51*[\text{НДТФ}] + 0,20*[\text{НМФ}]$	0,005 <0,01
21 сут после реанимации	$y_2 = -0,17*[\text{ФРПФ}] + 0,02*[^{14}\text{C}] - 2,04*[\text{НДТФ}] + 1,37*[\text{НМФ}]$ $y_2 = -0,17*[\text{ФРПФ}] - 2,06*[\text{НДТФ}] + 1,39*[\text{НМФ}]$ $y_2 = 0,06*[^{14}\text{C}] - 1,91*[\text{НДТФ}] + 1,25*[\text{НМФ}]$ $y_2 = -1,94*[\text{НДТФ}] + 1,29*[\text{НМФ}]$ (связ.)	<0,01 <0,01 <0,005 <0,025

Примечания: отклик y_2 – включение ^{14}C -гипоксантина в НДТФ печени; фактор [ФРПФ] – содержание ФРПФ в печени, фактор $[^{14}\text{C}]$ – общее включение ^{14}C -гипоксантина в хлорнокислый экстракт печени, фактор [НДТФ] – содержание НДТФ в печени, фактор [НМФ] – содержание НМФ в печени; P_s – показатель адекватности моделей: статистическая значимость связи между экспериментальными и модельными значениями отклика y_2 по критерию Спирмена.

Ю.В. Коновалов [8] отмечает, что в условиях мультиколлинеарности факторов аппроксимирующие свойства регрессионной модели остаются на высоком уровне, и на мультиколлинеарность можно не обращать внимания, если использовать уравнение регрессии только для предсказания, не выходя за цифровые границы экспериментальных данных, по которым была построена модель. Последнее соответствует условиям нашего исследования, поэтому мы подвергли интерпретации все регрессионные модели, представленные в

табл. 1 и 2, включая модели со связанными факторами.

Приведем пример интерпретации отдельно взятой модели из табл. 1, группа «6 ч после реанимации»:

$$y_1 = 0,71*[\text{ФРПФ}] + 1,05*[\text{НДТФ}].$$

Величина статистики критерия Фишера для данной модели $F=26,6$, модель по критерию Фишера адекватна с уровнем значимости $p<0,05$. Она адекватна также по критерию Спирмена, уровень значимости $P_s=0,05$. Оба фактора, ФРПФ и НДТФ, стоят в модели со знаком плюс, поэтому, чем больше их вели-

чины, тем больше величина отклика y_1 . Поскольку модель стандартизирована, по величине коэффициентов перед факторами можно сравнить силу влияния факторов на отклик: $1,05/0,71=1,5$. Значит, содержание НДТФ в печени крыс этой группы в полтора раза сильнее влияет на включение гипоксантина в НМФ, чем содержание ФРПФ.

Главный вопрос, на который должно ответить наше исследование, – является ли остаточная активность ГГФРТаза, ингибированной мононуклеотидами [23], лимитирующим фактором реутилизации гипоксантина *in situ*?

Известны патологические состояния у людей (болезнь Lesch-Nyhan, синдром Kelley-Seegmiller), при которых наблюдается врожденное отсутствие или резкое снижение активности ГГФРТаза в тканях. Дефицит ГГФРТаза у таких пациентов часто приводит к увеличению в их клетках содержания ФРПФ [20] и к активации синтеза пуринов *de novo* из низкомолекулярных предшественников [17]. В опытах М.-Ф. Vincent и соавт. [23] дефицит активности ГГФРТаза создавался другим способом: смесь аденозинтрифосфата, гуанозинтрифосфата, инозинмонофосфата и гуанозинмонофосфата в физиологических концентрациях ингибировала ГГФРТаза печени на 95%, но здесь, в отличие от врожденной недостаточности ГГФРТаза, имеет место, по мнению авторов, действие регуляторного механизма: баланс между активностями ГГФРТаза и ксантиноксидазы *in situ* определяет направление метаболизма гипоксантина, доставляемого кровью в печень со всего организма.

Ранее в постреанимационном периоде после 6,5-минутной асфиксии у крыс

мы обнаружили в их печени угнетение реутилизации гипоксантина на фоне повышения содержания ФРПФ и активации синтеза пуринов *de novo* [4, 5, 24] – парадоксальный факт, поскольку синтез пуринов *de novo* требует гораздо больших затрат веществ, энергии и времени по сравнению с реутилизацией гипоксантина. Это и привлекло наше внимание к работам [17, 20, 23]. Мы предположили, что в печени реанимированных крыс *in situ* активность ГГФРТаза почти полностью подавлена мононуклеотидами, как описано в работе [23], вследствие чего доступность ФРПФ и интенсивность поступления гипоксантина в печень не могут оказывать влияние на реутилизацию последнего.

Если данное предположение верно, тогда: а) в регрессионных моделях реутилизации гипоксантина факторы НДТФ и НМФ должны всегда стоять со знаком минус; б) цифровые коэффициенты перед НДТФ и НМФ должны быть гораздо больше, чем коэффициенты перед остальными факторами. Однако в нашем исследовании не нашлось ни одной группы подопытных животных, в которой эти два постулата выполняются. Напротив, как следует из табл. 1 и 2, на реутилизацию гипоксантина содержание НМФ влияет со знаком плюс в 23-ти из 29-ти адекватных моделей, а содержание НДТФ влияет со знаком плюс в 17-ти из 30-ти моделей, величины же цифровых коэффициентов перед факторами НДТФ и НМФ колеблются в очень широких пределах.

В дополнение к исследованию многофакторных регрессионных моделей мы провели парный корреляционный анализ при помощи коэффициента Спирмена. Оказалось, что включение

^{14}C -гипоксантина в НМФ не имеет отрицательной по знаку парной корреляции, хотя бы даже статистически незначимой – ни с содержанием НМФ, ни с содержанием НДТФ, ни с суммой содержаний НМФ+НДТФ – причем, отсутствие отрицательной корреляции характерно как для группы «Контроль», так и для всех без исключения групп реанимированных крыс – от 30 мин до 21 сут после реанимации.

Таким образом, снижение уровней НДТФ и НМФ не сопровождается усилением реутилизации гипоксантина. Это приводит нас к выводу, что протекание ГГФРТАзной реакции *in situ* не лимитируется ингибирующим влиянием мононуклеотидов.

Дальнейшее исследование регрессионных моделей было нацелено на установление роли ФРПФ. Первый этап реутилизации гипоксантина, в котором непосредственно участвует ФРПФ, – это реутилизация до НМФ, изучавшаяся нами по включению ^{14}C -гипоксантина в НМФ печени (табл. 1). В нашем исследовании было получено 10 адекватных моделей, в которых ФРПФ является одним из факторов, а включение ^{14}C -гипоксантина в НМФ – откликом. И оказалось, что во всех без исключения 10-ти моделях ФРПФ оказывает положительное влияние (перед ФРПФ стоит знак плюс) на реутилизацию гипоксантина (табл. 1). Напомним, что по методическим причинам мы определяли содержание ФРПФ в одном кусочке печени, а все остальные показатели – в другом ее кусочке, что, несомненно, «смазывало» связь ФРПФ с остальными факторами и с откликом. Но, раз уж закономерность проявилась сквозь эти помехи (причем, как у здоровых животных, так и на всех

сроках постреанимационного периода), то можно уверенно сделать вывод, что реутилизация гипоксантина до НМФ зависит *in vivo* от доступности ФРПФ.

Следующий этап реутилизации гипоксантина (до НДТФ) включает большое число реакций – ни в одной из которых, заметим, ФРПФ не участвует. В табл. 2 уровень ФРПФ представлен в качестве фактора регрессионных моделей в трех группах крыс: в группе «6 ч после реанимации» он оказывает влияние со знаком плюс в двух имеющихся моделях процесса реутилизации гипоксантина до НДТФ, но ФРПФ влияет со знаком минус на этот же процесс у здоровых животных (группа «Контроль») и у крыс, практически выздоровевших от постреанимационной болезни (группа «21 сут после реанимации»). Причина разнонаправленных влияний ФРПФ может заключаться в том, что от ФРПФ зависит биосинтез большого числа нуклеотидов, которые способны противоположным образом влиять на реакции превращения НМФ в НДТФ [1, 16, 19, 21].

Во всех без исключения адекватных моделях (табл. 1 и 2) включение ^{14}C -гипоксантина в хлорнокислый экстракт печени имеет связь со знаком плюс с интенсивностью реутилизации гипоксантина как до НМФ, так и до НДТФ. Поскольку модели стандартизированы, есть возможность сравнить влияние факторов на отклик. Сравнение показало, что включение ^{14}C -гипоксантина в печень сильнее влияет по сравнению с остальными факторами на реутилизацию гипоксантина до НМФ (табл. 1), но гораздо слабее влияет на его реутилизацию до НДТФ (табл. 2). В механизмах этого влияния еще предстоит разобраться. Так, имеются данные о том, что по-

ступление гипоксантина в клетку может зависеть от его внутриклеточной реутилизации [16, 19], а не наоборот.

Часть линейных регрессионных моделей, построенных нами, не выдержали проверку на адекватность и поэтому не вошли в табл. 1 и 2. В этих случаях для получения адекватных моделей в будущих исследованиях целесообразно увеличивать объем выборки n (число животных в группе) и/или переходить к нелинейным моделям.

Выводы

1. Протекание ГГФРТазной реакции в печени *in situ* не лимитируется ингибирующим действием мононуклеотидов.

2. Образование в этих условиях НМФ из гипоксантина зависит главным образом от доступности ФРПФ для ГГФРТазной реакции.

3. Между поступлением из крови в печень гипоксантина и его превращением в пуриновые мононуклеотиды существует прямая связь.

4. Перечисленные закономерности справедливы как для здоровых, так и для реанимированных крыс в течение всего изученного периода – от 30 мин до 21 сут после реанимации.

Список литературы

1. *Дмитриенко Н.П.* Пуриновый обмен и его регуляция в лимфоцитах. – Киев: Наукова думка. – 1991. – 200 с.
2. *Дрейпер Н., Смит Г.* Прикладной регрессионный анализ. – М.: Финансы и статистика. – 1987. – 351 с
3. *Дудиньска В., Хлынчак А.Й., Скотницка Е., Суска М.* Метаболизм пуринов в эритроцитах человека // Биохимия. – 2006. – Т. 71, № 6. – С. 581-591.
4. *Золин П.П., Конвай В.Д., Домрачев А.А.* Фракционирование пуриновых производных в изучении энергетического обмена // Вестн. Ом. ун-та. – 2017. – № 1. – С. 65-70.

5. *Золин П.П., Лебедев В.М., Конвай В.Д.* Математическое моделирование биохимических процессов с применением регрессионного анализа. – Омск: Изд-во Омского гос. ун-та. – 2009. – 344 с.
6. *Каркищенко Н.Н.* Альтернативы биомедицины. Т. 1. Основы биомедицины и фармако-моделирования. – М.: Изд-во ВПК. – 2007. – 320 с.
7. *Конвай В.Д., Золин П.П., Вейцман Г.Е.* Способ радиометрического определения содержания фосфорибозилпирофосфата в биологических тканях. – 1991. – А.с. 1802335 СССР.
8. *Коновалов Ю.В.* Статистическое моделирование с использованием регрессионного анализа. – М.: Изд-во МГТУ им. Н.Э. Баумана. – 2013. – 73 с.
9. *Крыштановский А.О.* Анализ социологических данных с помощью пакета SPSS. – М.: Изд. дом ГУ ВШЭ. – 2006. – 281 с.
10. *Кубышин В.Л., Горбач З.В., Мальевская Е.В.* Регуляторная роль транскетолазы и некоторых метаболитов пентозофосфатного пути в синтезе фосфорибозилпирофосфата гемолитами эритроцитов // Журнал ГрГМУ. – 2010. – № 1. – С. 39-42.
11. *Львовский Е.Н.* Статистические методы построения эмпирических формул. – М.: Высш. школа. – 1988. – 239 с.
12. *Орлов А.И.* Прикладная статистика. – М.: Экзамен. – 2006. – 671 с.
13. *Тюрин Ю.Н., Макаров А.А.* Анализ данных на компьютере. – М.: МЦНМО. – 2016. – 367 с.
14. *Шмойлова Р.А., Минашкин В.Г., Садовникова Н.А., Шувалова Е.Б.* Теория статистики. – М.: Финансы и статистика. – 2006. – 383 с.
15. *Юнкеров В.И., Григорьев С.Г.* Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. – СПб: ВМедА. – 2002. – 266 с.
16. *Buhl M.R.* Purine metabolism in ischemic kidney tissue // Dan. Med. Bull. – 1982. – V. 29, No. 1. – Pp. 1-26.
17. *Fu R., Sutcliffe D., Zhao H., Huang X., Schretlen D.J., Benkovic S., Jinnah H.A.* Clinical severity in Lesch-Nyhan disease: the role of residual enzyme and compensatory pathways // Mol. Genet. Metab. – 2015. – V. 114, No. 1. – Pp. 55-61.
18. *Harkness R.A., Saugstad O.D.* The importance of the measurement of ATP depletion and subsequent cell damage with an estimate of size and nature of the market for a practicable method // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1997. – V. 57, No. 8. – Pp. 655-672.

19. Harmsen E., de Tombe P.P., de Jong J.W., Achterberg P.W. Enhanced ATP and GTP synthesis from hypoxanthine or inosine after myocardial ischemia // *Am. J. Physiol.* – 1984. – V. 246, No. 1. – Pp. H37-H43.
20. Hasegawa H., Shinohara Y., Nozaki S., Nakamura M., Oh K., Namiki O., Suzuki K., Nakahara A., Miyazawa M., Ishikawa K., Himeno T., Yoshida S., Ueda T., Yamada Y., Ichida K. Hydrophilic-interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of erythrocyte 5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate in patients with hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2015. – V. 976-977. – Pp. 55-60.
21. Henderson J.F., Paterson A.R.P. Nucleotide metabolism. An introduction (Kindle Edition). – Burlington: Elsevier Science. – 2014. – 304 p.
22. López-Cruz R.I., Crocker D.E., Gaxiola-Robles R., Bernal J.A., Real-Valle R.A., Lugo-Lugo O., Zenteno-Savín T. Plasma hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase activity in bottlenose dolphins contributes to avoiding accumulation of non-recyclable purines // *Front. Physiol.* – 2016. – V. 7, article 213. – Pp. 1-8. – doi: 10.3389/fphys.2016.00213.
23. Vincent M.-F., Van der Berge G., Hers H.-G. Metabolism of hypoxanthine in isolated rat hepatocytes // *Biochem. J.* – 1984. – V. 222, No. 1. – Pp. 145-155.
24. Zolin P.P., Conway V.D. Disturbances of hypoxanthine metabolism in the liver of resuscitated rats // *Bul. Exper. Biol.* – 1997. – V. 124, No. 6. – Pp. 1180-1182.
5. Zolin P.P., Lebedev V.M., Conway V.D. Математическое моделирование биохимических процессов с применением регрессионного анализа [Mathematical modelling of the metabolic processes with the use of regression analysis]. Omsk: Izd-vo Omskogo gos. un-ta. 2009. 344 p. (In Russian).
6. Karkischenko N.N. Аl'ternativy biomeditsiny. T. 1. Osnovy biomeditsiny i farmakomodirovaniya [Biomedicine alternatives. Volume 1. Basic principles of biomedicine and pharmacomodelling]. Moscow: Izd-vo VPK. 2007. 320 p. (In Russian).
7. Conway V.D., Zolin P.P., Veytsman G.E. Sposob radiometricheskogo opredeleniya soderzhaniya fosforibozilpirofosfata v biologicheskikh tkanyakh [Method of radiometric determination of the content of phosphoribosyl pyrophosphate in biological tissues]. 1991. A.s. 1802335 USSR. (In Russian).
8. Kononov Yu.V. Statisticheskoe modelirovanie s ispol'zovaniem regressionnogo analiza [Statistical modelling with the use of regression analysis]. Moscow: Izd-vo MGTU im. N.E. Bauman. 2013. 73 p. (In Russian).
9. Kryshchanovskiy A.O. Analiz sotsiologicheskikh dannykh s pomoshch'yu paketa SPSS [Sociological data analysis using SPSS]. Moscow: Izd. dom GU VShE. 2006. 281 p. (In Russian).
10. Kubyshin V.L., Gorbach Z.V., Mal'evskaya E.V. Regul'yatornaya rol' transketolazy i nekotorykh metabolitov pentozofosfatnogo puti v sinteze fosforibozilpirofosfata gemolizataми эритроцитов [Regulatory role of transketolase and some metabolites of pentose phosphate pathway in the synthesis of phosphoribosyl pyrophosphate by erythrocyte hemolysates]. Journal of the Grodno State Medical University. 2010. No. 1. Pp. 39-42. (In Russian).
11. L'vovskiy E.N. Statisticheskie metody postroeniya empiricheskikh formul [Statistical methods of empirical formulas construction]. Moscow: Vyssh. shkola. 1988. 239 p. (In Russian).
12. Orlov A.I. Prikladnaya statistika [Applied statistics]. Moscow: Ekzamen. 2006. 671 p. (In Russian).
13. Tyurin Yu.N., Makarov A.A. Analiz dannykh na komp'yutere [Data analysis on the computer]. Moscow: MTsNMO. 2016. 367 p. (In Russian).
14. Shmoylova R.A., Minashkin V.G., Sadovnikova N.A., Shuvalova E.B. Teoriya statistiki [Theory of statistics]. Moscow: Finansy i statistika. 2006. 383 p. (In Russian).
15. Yunkerov V.I., Grigor'ev S.G. Matematiko-statisticheskaya obrabotka dannykh meditsinskikh issledovaniy [Mathematical and statistical data processing for medical research].

References

1. Dmitrienko N.P. Purinovy obmen i ego regul'yatsiya v limfotsitakh [Purine metabolism and its regulation in lymphocytes]. Kiev: Naukova dumka. 1991. 200 p. (In Russian).
2. Dreyper N., Smit G. Prikladnoy regressionnyy analiz [Applied regression analysis]. Moscow: Finansy i statistika. 1987. 351 p. (In Russian).
3. Dudin'ska V., Khlynchak A.Y., Skotnitska E., Suska M. Metabolizm purinov v eritrotsitakh cheloveka [Purine metabolism of human erythrocytes]. Biochemistry. 2006. V. 71. No. 6. Pp. 581-591. (In Russian).
4. Zolin P.P., Conway V.D., Domrachev A.A. Fraksionirovanie purinovykh proizvodnykh v izuchenii energeticheskogo obmena [Fractionating of the purine compounds for energy metabolism study]. Herald of Omsk University. 2017. No. 1. Pp. 65-70. (In Russian).

- Saint Petersburg: VMedA. 2002. 266 p. (In Russian).
16. **Buhl M.R.** Purine metabolism in ischemic kidney tissue. *Dan. Med. Bull.* 1982. V. 29, No. 1. Pp. 1-26.
 17. **Fu R., Sutcliffe D., Zhao H., Huang X., Schretlen D.J., Benkovic S., Jinnah H.A.** Clinical severity in Lesch-Nyhan disease: the role of residual enzyme and compensatory pathways. *Mol. Genet. Metab.* 2015. V. 114, No. 1. Pp. 55-61.
 18. **Harkness R.A., Saugstad O.D.** The importance of the measurement of ATP depletion and subsequent cell damage with an estimate of size and nature of the market for a practicable method. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1997. V. 57, No. 8. Pp. 655-672.
 19. **Harmsen E., de Tombe P.P., de Jong J.W., Achterberg P.W.** Enhanced ATP and GTP synthesis from hypoxanthine or inosine after myocardial ischemia. *Am. J. Physiol.* 1984. V. 246, No. 1. Pp. H37-H43.
 20. **Hasegawa H., Shinohara Y., Nozaki S., Nakamura M., Oh K., Namiki O., Suzuki K., Nakahara A., Miyazawa M., Ishikawa K., Himeno T., Yoshida S., Ueda T., Yamada Y., Ichida K.** Hydrophilic-interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of erythrocyte 5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate in patients with hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2015. V. 976-977. Pp. 55-60.
 21. **Henderson J.F., Paterson A.R.P.** Nucleotide metabolism. An introduction (Kindle Edition). Burlington: Elsevier Science. 2014. 304 p.
 22. **López-Cruz R.I., Crocker D.E., Gaxiola-Robles R., Bernal J.A., Real-Valle R.A., Lugo-Lugo O., Zenteno-Savín T.** Plasma hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase activity in bottlenose dolphins contributes to avoiding accumulation of non-recyclable purines. *Front. Physiol.* 2016. V. 7, article 213. Pp. 1-8. doi: 10.3389/fphys.2016.00213.
 23. **Vincent M.-F., Van der Berge G., Hers H.-G.** Metabolism of hypoxanthine in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* 1984. V. 222, No. 1. Pp. 145-155.
 24. **Zolin P.P., Conway V.D.** Disturbances of hypoxanthine metabolism in the liver of resuscitated rats. *Bul. Exper. Biol.* 1997. V. 124, No. 6. Pp. 1180-1182.

Mathematical modeling of the salvage pathway of hypoxanthine

P.P. Zolin, V.M. Lebedev, V.D. Conway

The aim of this paper is to develop mathematical models capable of simulating the hypoxanthine metabolism *in vivo*: hypoxanthine incorporation in the liver, its salvage pathway, the regulation of this process by mononucleotides and by phosphoribosyl pyrophosphate. Experiments were performed in male rats exposed to 6,5 min asphyxia with following resuscitation. Rats euthanized in 30 min, 6 h, 24 h, 3 days, 7 days and 21 days after resuscitation were compared with control animals. Authors conclude from mathematical modeling that the activity of liver hypoxanthine/guanine phosphoribosyltransferase *in situ* is regulated by the availability of phosphoribosyl pyrophosphate. The hypoxanthine inclusion in salvage pathway (^{14}C -hypoxanthine incorporation in nucleoside monophosphates, ^{14}C -hypoxanthine incorporation in nucleoside di- and triphosphates) was not influenced *in situ* by mononucleotides level.

Key words: purine metabolism, hypoxanthine, salvage pathway, mathematical modeling, phosphoribosyl pyrophosphate.