

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ  
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им. Г. Х. БУНЯТЯНА

МИКАЕЛЯН АЙК МИХАЙЛОВИЧ

**КОМПЬЮТЕРНАЯ ПРОГРАММА ИССЛЕДОВАНИЯ СВЯЗЫВАНИЯ  
РАДИОЛИГАНДОВ В КАРДИОМИОЦИТАХ В КООРДИНАТАХ  
СКЕТЧАРДА**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических  
наук по специальности 03. 00. 04 – «Биохимия»

Научный руководитель:

Академик Европейской Академии Наук и Искусств,  
доктор биологических наук, профессор Геворкян Г.А.

ЕРЕВАН – 2017

# ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	3
В В Е Д Е Н И Е.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1.1. Гомеостаз ионов кальция в миокарде .....	9
1.2. Панкреатит.....	25
1.3. Синдром длительного раздавливания .....	29
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	32
2.1. Экспериментальный материал.....	32
2.1.1. Получение митохондрий и саркоплазматического ретикулума .....	33
2.1.2. Обнаружение мембранных $Ca^{2+}$ - связывающих белков .....	34
2.1.3. Определение величины максимального связывания кальция ( $B_{max}$ ), константы диссоциации белков-лигандного комплекса ( $K_d$ ) и коэффициента корреляции кривой R. ....	34
2.2. Диалоговый компьютерный язык .....	35
2.2.1. Этапы работы с программой LEM II.....	38
2.2.2. Режимы работы.....	39
2.2.3. Операционная взаимосвязь между BACKGROUND режимом и BACKGROUND .....	39
2.2.4. Быстрый считыватель перфоленты .....	40
2.2.5. Назначение памяти.....	41
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ ..	42
3.1. Диалоговая программа Скетчарда для расчета специфического и неспецифического связывания. ....	42
3.2. Программа работы сцинтилляционного спектрометра SL-4221 с автоматическим расчетом специфического связывания в координатах Скетчарда. ....	49
3.3. Спектр аффинности кальция с мембранными белками саркоплазматического ретикулума.....	64
3.3.1. Экспериментальная модель острого панкреатита .....	64
3.3.2. Экспериментальная модель «синдрома длительного раздавливания» ....	71
3.4. Белковый спектр мембран саркоплазматического ретикулума .....	77
3.5. Сродство ионов кальция к мембранным белкам митохондрий миокарда при остром панкреатите и при «синдроме длительного раздавливания» .....	80
3.6. Морфологическое изучение развития некроза миокарда .....	83
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	90
В Ы В О Д Ы.....	95
ЛИТЕРАТУРА.....	96

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ОП – острый панкреатит

СДР – «синдром длительного раздавливания»

ПБП – пролином богатый пептид

о.м.м. – относительная молекулярная масса

$V_{max}$  – максимальное сродство ионов кальция

$K_d$  – константа диссоциации белок-рецепторного комплекса

R – коэффициент корреляции графика Скетчарда

$\sigma_t$  – достоверность

СР – саркоплазматический ретикулум

М – митохондрий

ЭР – эндоплазматический ретикулум

ПАБ – панкреатит-ассоциированный белок

ПЖ – поджелудочная железа

МДФ – миокард депрессирующий фактор

ФАТ – фактор активации тромбоцитов

ЦНС – центральная нервная система

РП – радиоактивный препарат

P – рецептор

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** В современной кардиологии центральное место отводится изучению метаболизма миокарда в норме и при различных патологических состояниях. Биохимические исследования позволяют подробно изучить метаболизм миокарда в норме и при различных его нарушениях, вызывающих некротическое повреждение. В настоящей работе рассматриваются вызывающие инфаркт миокарда острый панкреатит (ОП) и «синдром длительного раздавливания» (СДР). Как при ОП, так и при СДР, миокард повреждается под воздействием «миокард депрессирующего фактора», октапептида, в первом случае, и нонапептида – во втором. Октапептид вырабатывается ишемизированной поджелудочной железой, а нонапептид является фрагментом протеолиза мышечного миоглобина в результате раздавливания мышечной ткани при СДР в пост компрессионном периоде, и как было впервые показано в отделе «патологической биохимии» Института биохимии им. Г. Бунятына НАН РА, отличается от октапептида девятой, N-концевой аминокислотой, аргинином (Guevorgyan A.G. et al., 2016).

Точное понимание метаболизма кардиомиоцитов способствует выявлению новых путей целенаправленного воздействия на нарушенные звенья. Актуальным считается изучение действия природных биологически активных соединений в вопросе регуляции нарушенных звеньев метаболизма миокарда по вышеуказанным экспериментальным моделям. Изучение транслокации ионов Са, аффинность этих ионов к мембранным белкам саркоплазматического ретикулума (СР) и митохондрий (М) кардиомиоцитов может способствовать получению важной информации.

Одним из основных факторов нарушения функции миокарда является процесс нарушения величины транслокации  $Ca^{2+}$ , снижение аффинности к ионам кальция мембранных белков СР – пяти кислых белков, кальсеквестрина и Са-АТФ-азы. Подобные нарушения снижают сократительную способность миокарда, могут вызвать «текучесть мембран» СР и остановку сердца (Gordon L.M. & Sauerheber R.D., 1982). Обычно анализ систем с неспецифическим связыванием проводится на

основе координат Скетчарда. Подставляя значения в график, можно свободно прийти к аналитическому виду зависимости концентрации неспецифического лиганда от величины специфического связывания.

В данной работе используются понятия «специфического» и «неспецифического» связывания ионов Са, как это относится к изучению связывания лиганда, а в данной работе – радиолиганда, с их рецепторами. Наиболее широко используемое оперативное определение, а именно – связывание, не замещаемое избытком немеченого лиганда, часто неточно, что приводит либо к завышению числа высокоаффинных рецепторов и недооценке сродства данного лиганда к его рецептору, или, в криволинейной Скетчарда, предполагая наличие отрицательной кооперативности или нескольких классов сайтов связывания. Более того, рассматривается общее использование альтернативного подхода к неспецифическому связыванию, в котором неспецифический компонент оценивается из анализа общего связывания (Mendel С.М. & Mendel D.B., 1985).

Неспецифическое связывание меченого соединения в значительной степени обусловлено его концентрацией, концентрацией рецепторов и времени их контакта. Оптимальные соотношения этих факторов в каждом конкретном случае надо выбирать экспериментально. Однако, уменьшение концентрации меченого соединения и проведение анализа в кинетическом режиме должно способствовать уменьшению неспецифического связывания, что и, в сущности, делает возможным такое снижение, согласно требуемой чувствительности и соотношения констант скоростей образования специфического и неспецифического комплексов (Scatchard G., 1949; В кн: «Аналитическая химия. Проблемы и подходы», М., 2004).

Для решения вышеизложенной проблемы разработана программа расчета величин аффинности ионов Са к мембранным белкам СР и М миокарда с использованием радиолиганда ( $^{45}\text{Ca}^{++}$ ) и расчет величин связывания на жидкостном сцинтилляционном спектрометре SL-4221 (Roche-Bioelecrtonique, France).

На экспериментальных моделях повреждения миокарда, как панкреонекроз и некротическое повреждение при СДР, изучали количественные и качественные сдвиги ионов Са в кардиомиоцитах, аффинность ионов Са к мембранным белкам Ср и М. Зарегистрированные нарушения метаболизма кардиомиоцитов корректировали

открытым акад. А. Галояном природным цитокином «пролин богатым пептидом» (Galoyan A.A., 2002; Galoyan A.A., 2004).

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящей диссертационной работы явилось изучение сродства мембранных белков СР и М к ионам кальция с использованием метода сцинтилляционной спектрометрии, в частности, разработки компьютерной программы для обработки полученных результатов в координатах Скетчарда.

В задачи диссертационной работы входило:

1. разработать программу машинной обработки полученных результатов по сродству белков к ионам кальция в координатах Скетчарда, что сделает возможным получение сопоставимых результатов по сериям эксперимента. Для этого компьютерная программа должна быть разработана на основе диалогового компьютерного языка LEM-II, которым снабжены процессоры сцинтилляционных спектрометров серии SL, фирмы Roche-Bioelktronoque Kontron, France;
2. используя радиолиганд –  $^{45}\text{CaCl}_2$ , в условиях *in vivo*, изучить сродство ионов кальция к мембранным белкам СР и М кардиомиоцитов, выявить связывающие кальций белки и рассмотреть изменения их сродства при некротическом повреждении миокарда;
3. для построения графиков Скетчарда с коэффициентом корреляции 90% рассчитать соотношение концентраций радиолиганда и немеченого лиганда;
4. воссоздать картину инфаркта миокарда на экспериментальных моделях острого панкреатита (ОП) и «синдрома длительного раздавливания» (СДР);
5. изучить воздействие природного биологически активного цитокина – «пролином богатого пептида» - ПБП на метаболизм миокарда и, как следствие, на сродство мембранных белков СР и М к ионам кальция.

**Научная новизна работы.** Впервые показано то, что сродство мембранных белков СР и М к ионам кальция, как при ОП, так и при СДР, меняется. По своей картине, при ОП и СДР, эти изменения идентичны. В частности, представляют

интерес факт резкого изменения транслокации ионов  $\text{Ca}^{++}$  и их аффинность в СР. Изменения распределения  $\text{Ca}^{++}$  компенсируются проявлением нового  $\text{Ca}^{++}$ , связывающего свойства у мембранного белка с о.м.м. 32 кДа, который у интактных животных подобными характеристиками не обладал.

Для получения статистически достоверных результатов об уровне сродства мембранных белков к ионам кальция, применяется метод Скетчарда. Более того, была разработана программа изучения уровней специфического и неспецифического сродства с применением радиолиганда и компьютерной обработки графиков Скетчарда непосредственно на сцинтилляционном спектрометре в процессе измерения активностей образцов. Показано, что свойство мембранного белка с о.м.м. 32 кДа – связывать приобретаемый за счет включения в аминокислотный состав дикарбоновых аминокислот кальций, что делает возможным связывание двухвалентного кальция карбоксильными группами аминокислот. Свидетельством этого является снижение кислотности данного белка с рН 8,3 до рН 6,8. Уровень сродства возрастает параллельно со снижением аффинности у классических мембранных белков СР, по всей вероятности, выполняя компенсаторную роль в сохранении целостности СР и миокарда в целом. Кроме того, показана высокоактивная роль природного цитокина ПБП в восстановлении нарушенного при патологии СДР и ОП сродства мембранных белков СР и Мх кардиомиоцитов с полным восстановлением картины спектра аффинности ионов кальция со спектром у интактных животных.

**Практическая значимость работы.** Изучение нарушения метаболизма миокарда и степень его повреждения при СДР и ОП делает возможным идентификацию потенциальных нарушений, изыскание путей восстановления и регулирования метаболизма, а также – возможной экстраполяции полученных результатов на практике. Воссозданные нами экспериментальные модели ОП и СДР дают полную картину развития двух патологий, что в эксперименте делает возможным изучение развития нарушений на разных этапах патогенеза и анализ путей целенаправленного воздействия на нарушенные звенья. Используя биоптат больного онкологией и применяя программу экспресс определения специфического связывания химиопрепаратов можно определить минимальную дозу для проведения

химиотерапии, по возможности снижая токсическое воздействие на организм. Материалы экспериментальных результатов можно включить в курс общей и клинической биохимии в вузах и специальных учебных медицинских центрах.

**Апробация работы.** Основные результаты настоящей работы были представлены и обсуждены на семинаре в бизнес-университете Nyenrode (Nyenrode Business Universiteit, Брёкелен, Нидерланды, 2017г.), на семинарах и заседаниях ученого совета Института биохимии им. Г. Х. Бунятына НАН РА (2014 – 2017).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 3 печатные работы.

**Объём и структура работы.** Работа изложена на 108 страницах машинописного текста, содержит 3 таблиц и 14 рисунков. Библиография включает 134 литературных источника на русском и английском языках. Состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, изложения полученных экспериментальных результатов, заключения, выводов и списка использованной литературы.

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Гомеостаз ионов кальция в миокарде

Сократительная способность миокарда определяется количеством и качеством ионов кальция, доступного для взаимодействия с миофибриллярным комплексом сократительных белков, что и регулируется при непосредственном влиянии бета-агонистов. Такой эффект катехоламинов опосредован увеличением систолического входа  $Ca^{2+}$ -АТФазной активности, изменением чувствительности тропонина-С к ионам кальция. Эти биохимические проявления реализуются путем фосфорилирования белков, катализируемых цАМФ-зависимой протеинкиназой. Фосфорилирование белков может происходить и под действием  $Ca^{2+}$ -кальмодулинзависимой протеинкиназой, которая также активируется при повышении внутриклеточной концентрации кальция. Так, добавление в среду кальмодулина, в котором содержатся кальций и мембраны саркоплазматического ретикулума, вызывает фосфорилирование фосфоламбана (Kirchberger M. A. & Antonenc T., 1982; Frank K. & Kranias E.G., 2000; MacLennan D.H. & Kranias E.G., 2003). Исследования механизма действия цАМФ выявило важность фосфорилирования белков в качестве регуляторного механизма, в котором кальций также непосредственное участие принимает. Синаптосомальная регуляция некоторых регулируемых  $Ca^{2+}$ -фосфобелков из мозга крыс показали, что эти белки могут быть вовлечены в регуляцию высвобождения нейротрансмиттеров (De Lorenzo R.J. et al. 1979; Yamahuchi T. & Fujisawa H., 1979).

Эндоплазматический ретикулум (ЭР) представляет собой морфологически и функционально разнообразные органеллы, способные интегрировать множественные внеклеточные и внутренние сигналы и генерировать адаптивные клеточные ответы. Он играет фундаментальную роль в синтезе и сведении белков, а также – в реакции клеток на метаболический и протеотоксический стресс. Кроме того, ЭР хранит и выпускает  $Ca^{2+}$  в сложных сценариях, которые регулируют ряд процессов в возбудимых клетках по всему организму, включая сокращение мышц и расслабление, эндокринную регуляцию метаболизма, обучение, память и гибель

клеток. Одна или несколько  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз и два типа каналов мембран  $\text{Ca}^{2+}$  ЭР (рецепторы инозитолтрифосфата и рианодина) являются основными белками, участвующими в поглощении и высвобождении эндоплазматическим ретикуломом  $\text{Ca}^{2+}$ . Существуют также прямые и косвенные взаимодействия хранилищ ЭР  $\text{Ca}^{2+}$  с плазматической мембраной и митохондриальными системами  $\text{Ca}^{2+}$ -регуляции. Фармакологические агенты, которые избирательно модифицируют высвобождение или поглощение эндоплазматическим ретикуломом  $\text{Ca}^{2+}$ , позволили провести исследования, которые выявили много разных физиологических функций для передачи сигналов ER  $\text{Ca}^{2+}$ . Несколько наследственных заболеваний вызваны мутациями в ЭР  $\text{Ca}^{2+}$ -регуляторных белках, и нарушенный ЭР  $\text{Ca}^{2+}$  гомеостаз участвует в ряде приобретенных нарушений. Доклинические исследования предполагают терапевтический потенциал для использования агентов, предназначенных для систем обработки ЭР  $\text{Ca}^{2+}$  возбудимых клеток при нарушениях, начиная от сердечных аритмий и миопатии скелетных мышц до болезни Альцгеймера.

Существуют два  $\text{Ca}^{2+}$  канала саркоплазматического ретикулула, которые генерируют высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из сигнального пути клеток (из просвета CP) в цитозоль. Первым обсуждаемым вопросом является IP3R (инозитол 3 фосфатным рецептором), который является внутриклеточным лиганд-закрытым  $\text{Ca}^{2+}$  каналом, с шестью трансмембранными доменами в карбоксильном терминале, локализованными на мембране CP (Bezprozvanny, 2005; Foskett et al., 2007; Yule Et al., 2010). Его лиганд – IP3, является вторым мессенджером, генерированным из Gq-связанных или связанных с тирозинкиназой рецепторов на плазматической мембране. Они включают в себя, но не ограничиваются ими, рецепторы 1 и 5, рецепторы метаботропных глутаматов I группы, рецепторы мускаринового ацетилхолина m1 и m3,  $\alpha$ 1-адренергические рецепторы, рецептор P2Y1 и несколько других типов рецепторов P2Y и P2X (James G., Batt A.M., 2002).

Инозитол-3-фосфат (IP3) не является единственным регулятором функции IP3R;  $\text{Ca}^{2+}$  сам по себе является аллостерическим модулятором IP3R и играет критическую роль в формировании вызванного IP3R  $\text{Ca}^{2+}$ -реакта. В целом, эта регуляция следует двухфазной колоколообразной кривой для всех подтипов, так что

низкие концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (<300 нМ) активируют канал и увеличивают его открытую вероятность, тогда как высокие концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  ингибируют открытие канала (Thrower et al., 2001; Foskett et al., 2007).

Этот положительный и отрицательный цикл обратной связи хорошо подходит для генерации  $\text{Ca}^{2+}$  колебаний или волн. Формы двухфазных кривых, как правило, аналогичны трем подтипам IP3R, но незначительные несоответствия могут придать важные функциональные различия. Например, активация  $\text{Ca}^{2+}$  в каналах IP3R1 проявляет положительную кооперативность, позволяя резко и быстро увеличивать отверстие канала в узком  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Эта динамика сильно поддерживает процесс  $\text{Ca}^{2+}$  - выведенное высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR), при котором локальные повышения внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  усиливаются высвобождением  $\text{Ca}^{2+}$  из CP  $\text{Ca}^{2+}$  магазинов. Открытая вероятность каналов IP3R3 возрастает в более широком диапазоне концентраций  $\text{Ca}^{2+}$  с более высоким сродством к  $\text{Ca}^{2+}$ , что приводит к активности канала, который чувствителен к низкой [IP3] (Mak & Foskett, 1997; Boehning et al., 2001; Tu et al., 2005; Foskett et al., 2007).

$\text{Ca}^{2+}$  не может свободно открыть IP3R в отсутствие IP3, поскольку именно он и увеличивает вероятность IP3R. Это координирует сценарий, при котором  $\text{Ca}^{2+}$ , высвобожденный из одного канала, может облегчать высвобождение из другого, вызывая регенеративное высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  внутри или между классами  $\text{Ca}^{2+}$  - каналов (Berridge M.J., 2002). Поскольку сигналы  $\text{Ca}^{2+}$  могут кодироваться как во временной, так и в пространственной областях, колебательная природа высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$ , вызванного IP3, может иметь важное функциональное значение. Например, колебания  $\text{Ca}^{2+}$  определенных частот могут активировать транскрипцию генов или другие пути передачи сигнала (Carrasco M.A. et al., 2004). Пространственный разброс и амплитуда или количество высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  могут запускать различные нижестоящие  $\text{Ca}^{2+}$  -чувствительные каскады в зависимости от относительной аффинности связывания. В общем, цитозольная диффузия  $\text{Ca}^{2+}$  из IP3R довольно ограничена, в основном из-за сильной буферной способности  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле и создает крутой градиент концентрации, происходящий от сайта высвобождения CP. В устье канала концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  может превышать > 100 мкМ, а на расстоянии нескольких микрометров концентрация может составлять 1 мкМ, а

при нормальных условиях функциональный диапазон составляет приблизительно 5 мкМ (Allbritton N. L. et al., 1992). Однако в условиях чрезмерного высвобождения CP  $Ca^{2+}$  например, с некоторыми мутациями, вызывающими болезнь Альцгеймера или болезнь Хантингтона, эти сигнальные шаблоны могут быть изменены (Goussakov V.L., 2010; Zhang H. et al., 2010).

Второй обсуждаемый CP  $Ca^{2+}$  - канал – RyR (рианодиновые рецепторы), высоко конференционный, относительно неспецифический катионный канал (~ 100-150 pS для  $Ca^{2+}$ ) в мембране CP. Он повсеместно экспрессируется в большом числе клеток и поддерживает широкий спектр сигнальных событий  $Ca^{2+}$ . Он, по общей структуре, похож на IP3R, особенно в порах каналов, но, при ~560 кДа с многочисленными вспомогательными белками, RyR является одним из крупнейших комплексов каналов, идентифицированных до настоящего времени (Maskrill J. J., 2010). Геном млекопитающих включает три гена, расположенных на разных хромосомах, которые кодируют рианодиновые рецепторные белки RyR1, RyR2 и RyR3; Эти три RyR показывают примерно 70% гомологии последовательностей. Каждая изоформа может подвергаться посттрансляционной и посттранскрипционной регуляции и может экспрессировать многочисленные варианты сплайсинга (Fill M., And Corello J.A., 2002). Несмотря на потенциальную изменчивость, отдельные каналы функционируют как гомотетрамеры.

RyR1 является наиболее изученной изоформой на сегодняшний день и преобладает в скелетных мышцах, где он функционирует в сочетании между возбуждением и сжатием и мышечным сокращением. Он также описан в нейронах Пуркинье мозжечка (Furuichi T., et al., 1994; Hertle D. N. and Yeckel F., 2007). RyR2 в значительной степени экспрессируется в сердечной мышце, а также является обнаруженной в мозге преобладающей формой. RyR3 следует более низкоуровневой и широко распространенной форме экспрессии и встречается в полосатой, гладкой и сердечной мышцах, а также в Т-лимфоцитах и в мозге, особенно в областях, участвующих в обучении и памяти (коре и гиппокампе) (Arredouani A., 2004; Hertle D. N. and Yeckel M. F., 2007)

Стимулирование захвата кальция с помощью ацетилхолина, гормонов и др. факторов вызывает ответ со стороны поджелудочной железы в виде высвобождения

амилазы. Внутриклеточное введение кальция вызывает достоверный физиологический эффект, идентичный ацетилхолину, т.е. деполяризацию с увеличением мембранной резистентности. Идентично активируется экзоцитоз в ацинусах поджелудочной железы, включающий мобилизацию внутриклеточного пула кальция. В экзокринной части поджелудочной железы, включающий мобилизацию внутриклеточного пула кальция.

В экзокринной части поджелудочной железы большое значение имеет количество рецепторов в контроле экзоцитоза ионами кальция или регуляция транспорта бикарбоната циклическим АМФ. Карбахол и церулеин стимулируют захват  $^{22}\text{Na}^+$   $^{36}\text{Cl}^-$  дисперсными ацинарными клетками, кальций потенцирует этот эффект (Putney J.W. et al., 2016; Wang H. et al., 2016).

На культуре клеток эмбриональных миоцитов была показана роль кальция в развитии оксидативного стресса и смерти клеток (Mitsumoto H. et al., 2008; Peng T. I. & Jou M.J., 2010).

Благодаря многочисленным исследованиям, удалось показать изменения внутриклеточных систем миокарда, ответственных за гомеостаз кальция, при постишемии. Так, продолжительность ишемии увеличивает пассивный транспорт кальция в сарколемму. В первые минуты ишемии, когда не наблюдается изменения кальциевого тока в сарколемму, происходит понижение активности  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATФазы}$ , аденилатциклазы, замедляется  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^+$  - обмен. Следовательно, существуют по крайней мере 3 системы, на которых наблюдается влияние ранней стадии ишемии без изменения уровня пассивного транспорта кальция. Саркоплазматический ретикулум в этих же условиях проявляет снижение аккумулирующей способности ионов Са вследствие истощения запасов АТФ (Davis T.N., 1992; Stutzmann G.E. et al., 2011).

В отношении митохондрий выявлена закономерность снижения активности к синтезу АТФ, затрудняется его реперфузия, что приводит к накоплению ионов Са и снижения скорости рефосфорилирования АДФ. Вместе с этим доказано, что глубокая ишемия, которая приводит саркоплазматический ретикулум к полной потере  $\text{Ca}^{2+}$ -аккумулирующей способности митохондрии, в состоянии частично покрыть эти потери (Gwathmey J.K. et al., 1993; 2013; Gordan L. et al., 2016).

Во время внутриклеточной передачи сигналов  $\text{Ca}^{2+}$  митохондрии накапливаются значительные количества  $\text{Ca}^{2+}$  из цитозоля. Митохондриальное поглощение  $\text{Ca}^{2+}$  контролирует скорость выработки энергии, формирует амплитудные и пространственно-временные картины внутриклеточных сигналов  $\text{Ca}^{2+}$ , играет важную роль в гибели клеток. Это поглощение  $\text{Ca}^{2+}$  осуществляется митохондриальным  $\text{Ca}^{2+}$ -юнипортером (MCU), расположенным во внутренней мембране органеллы. Юнипортером пропускает  $\text{Ca}^{2+}$  вниз по электрохимическому градиенту, поддерживаемому на этой мембране, без прямого связывания с АТФ-гидролизом, или перенос других ионов. Носители характеризуются номерами оборотов, которые, как правило, в 1000 раз ниже ионных каналов, и до сих пор неясно, является ли MCU несущей или каналом. При помощи патч-фиксации внутренней митохондриальной мембраны было идентифицировано ранее неизвестный  $\text{Ca}^{2+}$ -селективный ионный канал, чувствительный к ингибиторам поглощения  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях. Канал является внутренним выпрямлением, что делает его особенно эффективным для поглощения  $\text{Ca}^{2+}$  в активированные митохондрии (Kirichok Y. et al., 2004).

Широко известно, что кальций является важным регулятором функции миокарда. Быстрая транспортировка кальция через плазматическую мембрану и внутри клетки способствует комплексным белковым взаимодействиям, необходимым для поддержания сократимости и сердечной функции. Митохондрии зависят от поглощения кальция для производства АТФ и удовлетворения энергетических потребностей сердца с контактом во время каждого сердечного цикла. Механизмы регуляции кальция митохондриями недостаточно изучены. Поглощение кальция в митохондриях может происходить быстро, и митохондрии могут точно отслеживать изменения в цитозольном кальции на основе ритма измельчения (Robert V. et al., 2001; Maack C. et al., 2006). Кальций может поставляться в митохондрии из внутренних хранилищ, таких как саркоплазматический ретикулум и от переноса ионов через плазматическую мембрану большим электрохимическим градиентом кальция. Относительный вклад этих источников кальция в функцию митохондрий не был исследован. В настоящее время признано, что приток кальция через канал  $\text{Ca}^{2+}$  только L-типа является достаточным для изменения функции митохондрий.

Регулирование митохондрий каналом также зависит от связи актиновых филаментов.

Поддержание гомеостаза кальция необходимо для жизни. В сердце кальций играет важную роль во многих клеточных процессах, включая иницирование и поддержание сокращения. В этот процесс вовлечены несколько клеточных поверхностных мембран и внутриклеточных кальциевых каналов и транспортеров. В сердечной мышце приток кальция во время деполяризации потенциала действия инициирует последовательность событий, приводящих к сужению (Bers D.M., 2008). Иницирование сокращения требует увеличения внутриклеточного кальция от концентрации покоя приблизительно от 100 нМ до 1 мкМ.4,5. При нормальной функции, приток кальция через канал  $Ca^{2+}$  L-типа необходим для ответа (однако при определенных патологических состояниях, где нагрузка саркоплазматического ретикулума высока, спусковой механизм кальция может возникнуть из саркоплазматического ретикулума (Eisner D.A. et al., 2009). Увеличение внутриклеточного кальция приводит к дальнейшему высвобождению кальция из запасов саркоплазматического ретикулума через рианодиновые рецепторы (RyR). Высвобождение кальция может быть дополнительно усилено активацией инозитолтрифосфатных рецепторов (IP3R). Этот процесс амплификации, называемый кальциевым высвобождением кальция, обеспечивает быстрое и значительное увеличение внутриклеточного кальция, который необходим для сокращения.

Существуют перекрестные помехи между каналами  $Ca^{2+}$  L-типа и митохондриями.

Итак,

1. кальций необходим для функции миокарда, включая сокращение и поддержание сердечного выброса. Кальций необходим также для энергетики миокарда и производства АТФ с помощью митохондрий, но механизмы регуляции кальция митохондриями еще не полностью решены;
2. цитоскелет играет важную роль в поддержании целостности клетки. В настоящее время признано, что цитоскелетные белки могут также

способствовать передаче сигналов от плазматической мембраны к внутриклеточным органеллам. Цитоскелетные белки могут регулировать функцию  $\text{Ca}^{2+}$ -канала L-типа и изменять внутриклеточный гомеостаз кальция;

3. вышеприведенные данные свидетельствуют о том, что приток кальция через канал  $\text{Ca}^{2+}$  L-типа достаточен для изменения ряда функциональных параметров митохондрий, включая продуцирование супероксида, продукцию NADH и метаболическую активность, оцениваемую как образование формазана из соли тетразолия. Это происходит в зависимости от кальция;
4. активация  $\text{Ca}^{2+}$ -канала L-типа также изменяет потенциал митохондриальной мембраны иным, независимым от кальция, путем, и этому способствует перемещение вспомогательной  $\beta 2$ -субъединицы через филаменты F-актина;
5. поскольку канал  $\text{Ca}^{2+}$  L-типа является инициатором сокращения, функциональная связь между каналами и митохондриями может помочь в удовлетворении потребности в энергии миокарда на основе сокращений.

Ионам кальция приписывается важная роль в стабилизации клеточных мембран. После перфузии сердца буфером, не содержащим кальций, наблюдается способность кардиомиоцитов в регуляции проницаемости плазматических мембран для воды и различных ионов. При этом механическая активность миокарда быстро исчезает, а электрическая активность сохраняется, происходит вытекание кальция и калия во внеклеточное пространство. Если после нескольких минут перфузии сердца в бескальциевый раствор добавить ионы кальция, то развивается последовательность событий, которая известна как «кальциевый парадокс». Введение кальция в перфузат приводит к фрагментации плазматической мембраны, массивному притоку кальция в клетку, который сопровождается необратимой контрактурой и высвобождением из цитоплазмы  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  и растворимых фракций, истощением запасов макроэргических фосфатов, нарушением деятельности саркоплазматическим ретикулума, выходом из клеток во внеклеточное пространство некоторых внутриклеточных компонентов, как например, миоглобин и креатинкиназа (Naylor W.G., 1999; Sheikh I., 2006; da Rosa R. et al., 2017). Эти данные позволяют

сделать вывод о том, что феномен «кальциевого парадокса» - это АТФ-зависимая транспортная система переноса кальция. В возникновении «кальциевого парадокса» важное место отводится также липидным компонентам мембран, которые и регулируют степень текучести мембран и их стабильность (Gordon L.M. & Sauerhber R.D., 1982; Waring A.J. et al., 2016). Существование «кальциевого парадокса» хорошо установлено, однако его патофизиология не вполне ясна. Решение проблемы путей поступления кальция остается главной задачей. Одни исследователи отдают предпочтение медленным кальциевым каналам для поступления кальция, другие, наоборот, отрицают этот путь поступления (Lee M.Y. et al., 2017; Wu J. et al., 2017).

При эмбриональном и постэмбриональном развитии сердца, происходит изменение текучести клеточной мембраны (микровязкости). В процессе его развития она одновременно увеличивается как в отношении к уровню холестерина к фосфолипидам сарколеммы, так и к числу ненасыщенных остатков жирных кислот. Все эти изменения очень сложны, чтобы обнаружить их корреляцию с проницаемостью ионов  $K^+$ . Текучесть мембран культуры клеток миобластов эмбриона увеличивается при их слиянии с образованием миотубул (Wu J. et al., 2016).

Поступление кальция при «кальциевом парадоксе» представляет собой очень сложный процесс, т.к. перфузию миокарда вызывают без раствора кальция, что и вызывает дезорганизацию структуры гликокаликса, образование широких щелей между вставочными дисками вместо плотного прилегания дисков. Подобные нарушения структуры миокарда способствуют более легкому проникновению ионов кальция в кардиомиоциты. Повторное кратковременное истощение и увеличение концентрации кальция в миокарде являются предпосылками развития «кальциевого парадокса», при котором кардиопротекторное воздействие может оказать влияние на высвобождение аденозина и механизмы модуляции G белка (Ashraf M. et al., 1994).

При перфузии миокарда бескальциевым раствором, однако содержащим хелаторы кальция, удалось показать изменение работы медленных каналов, делая их непроницаемыми для натрия, что в свою очередь, способствует незначительному повышению уровня натрия в цитозоле, что и активирует  $Na^+-Ca^{2+}$  обмен,

приводящего к повышению тканевого содержания кальция. Не менее интересным считается массивный приток кальция при пост гипоксической реоксигенации, что является результатом активации диффузии через поврежденную мембрану.

Последствием кальциевой перегрузки в кардиомиоцитов может быть перераспределение кальция внутри клетки, однако результатом массивного притока кальция в клетку развивается снижение концентрации АТФ вследствие активирования липаз и протеаз и, обусловленное ими, повреждение ткани, внезапное развитие контрактур, напряжение и разрушение ткани миокарда, разобщение окислительного фосфорилирования, высоких концентраций кальция, уменьшение содержания адениннуклеотидов вследствие повышения их выхода из митохондрий в растворимую фракцию клеток.

Митохондрии также способны активно поглощать кальций в количестве, примерно равном поглощению со стороны саркоплазматического ретикула, но не принимают участие в электромеханическом сопряжении. Митохондрии сердца служат местом депонирования ионов кальция, дополняя саркоплазматический ретикулум. Изучение показало, что перенос пары электронов через каждый из трех участков сопряжения дыхательной цепи ведет к накоплению митохондриями двух ионов кальция митохондриями. Однако чрезмерное накопление кальция митохондриями приводит к повреждению механизма сопряжения. Показано  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированное набухание митохондрий, которое ингибируется низкими концентрациями антагонистов калмодулина. Аффинность кальция к набуханию митохондрий проявляется в двух точках – низким и высоким сродством (Hatase O. et al., 1987; Tsumura T. et al., 1999).

Сокращение миокарда обеспечивается высвобождением энергии, которое может быть 4-типов: три типа высвобождения энергии зависят от давления в миокарде (это H1, H2, H4 типы высвобождения), а H3, зависит от интеграла времени давления. Все 4 типа высвобождения энергии кальций зависимы (Ponce-Hornos J.E. et al., 1995; Savio-Galimberti E. et al., 2006).

Действия гормонов, нейротрансмиттеров, факторов роста реализуются через клеточные мембранные рецепторы в результате повышения уровня внутриклеточного кальция и ответа клетки на это повышение. Сигнал кальция в

клетку передается с помощью высокоаффинных кальций-связывающих белков, которые характеризуются наличием EF-hand структурных элементов, а также – кальций и фосфолипид-зависимыми белками. Дискуссии о методах очистки, распределение, структуры белков, локализации генов и хромосом, а также физиологической роли кальций-связывающих белков продолжают (Heizmann C.W., 1992; Cariod T. et al., 2016).

Все высокоаффинные кальций-связывающие белки имеют EF-hand (завиток-петля-завиток) конфигурацию, характерную для высокоаффинного участка белка. Первым изученным в этом аспекте белком был парвальбумин (Kretsinger R.H., 1975).

Саркоплазматический ретикулум млекопитающих представляет собой ограниченную мембранной структурой, которая образует окружающую миофибриллы сеть. После фракционирования мембран везикул саркоплазматического ретикулума на полиакриламидном геле получается картина белкового спектра, основным компонентом которого является белок с Mr 100 кДа, обладающий АТФ-азной активностью, выполняющий основную функцию в транспорте ионов кальция через мембрану СР. Кальций-АТФаза белок состоит из одной полипептидной цепи с молекулярной массой 100 кДа, один моль которого может связать примерно 2 моля высокоаффинных мест связывания кальций ( $K_d=0.3$  мкМ) и 1 моль высокоаффинных мест связывания АТФ ( $K_d=0.5-3.0$  мкМ). Гидрофобный участок этого полипептида связан с липидной фазой мембраны, в то время как гидрофильный участок, вероятно, выступает из поверхности мембраны СР со стороны цитоплазмы клетки. Обработка трипсином расщепляет молекулу кальций-АТФазы сначала на два полипептида (А = 55 кДа, Б = 45 кДа). При дальнейшей обработке фрагмент расщепляется еще на 2 фрагмента (А1 = 30 кДа, А2 = 25 кДа). Полученные после обработки трипсином фрагменты кальций-АТФазы содержат как гидрофобные, так и гидрофильные участки и остаются тесно связанными с мембраной. Обнаружены также полосы с Mr 50 - 60 кДа – кальсеквестрин, белок с высоким сродством к кальцию (<800 нМ кальций), Mr 22 кДа – фосфоламбан, белок служащий субстратом протеинкиназы и управляющий работой кальций-насоса СР, а также 5 кислых белков с различными значениями Mr.

Показано, что формирование фосфоламбана происходит и в самом сердце. Добавление изопротеренола в перфузионный раствор приводит к усилению фосфорилирования фосфоламбана с одновременным увеличением скоростей развития механического напряжения и расслабления (Le Peuch C.J. et al., 1980; Lindemann J.P. et al., 1983; Egelhaaf M. et al., 2014).

Итак, для нормального функционирования сердца необходимо не только наличие определенной концентрации кальция в работающем сердце и при покое, но и состояние кальций-связывающих белков кардиомиоцитов, и, в особенности, кальций-связывающих белков саркоплазматического ретикулума, который зависит от кислотно-щелочной характеристики каждого отдельного кальций-связывающего белка, обуславливающего также количество связывающего кальция (Zakharov S.D. et al. 1996; Shonberg J. et al., 2011; Guevorgyan A.G., 2014).

Когда  $\text{Ca}^{++}$ -связывающие белки частичны или полностью теряют сродство с ионами кальция увеличивая концентрацию в  $\text{Ca}^{++}$  в саркоплазматическом ретикулуме, активизируется процесс «кальциевого парадокса», т.е. концентрация кальция в мембранах CP резко снижается, и органеллы перестают выполнять свои функции, что приводит к немедленной остановке сердца (Kojima A. et al., 2010).

В 1970-1980 годах патофизиологическая важность кальция для сердца была в центре научного сознания. Парадокс кальция рассматривали как парадигму в этой области исследований, которые показали, что обедненное сердце приводит к массовому  $\text{Ca}^{2+}$  приток в клетки миокарда. Подобное явление также наблюдается и в других ситуациях тяжелой травмы клеток миокарда. В частности, была принята гипотеза о том, что парадокс кальция представляет собой парадигму для патомеханизма тяжелой травмы ишемии-реперфузии.

Другая причина интереса к парадоксу кальция заключается в том, что это явление имеет очевидное отношение к разработке кристаллоидными кардиоплегических решений, для изучения которых было потрачено немало усилий с 1960 года. Противоположные полюса для наилучшей стратегии в достижении защиты миокарда были блокировка  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ , удаление  $\text{K}^+$  и  $\text{Mg}^{2+}$  и увеличения, больше чем физиологическая концентрация,  $\text{Na}^+$  в перфузионной среде.

Изучение парадокса кальция продолжается и по сей день. В последние десятилетия этот термин все чаще используется в исследованиях по инфарктам кальциевой перегрузки, вызванные в "реверсном режиме" активацию сарколемного  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  обменника.

Изучение аффинности радиолиганда (в настоящей работе –  $^{45}\text{CaCl}_2$ ) с рецептором (мембранные белки CP и M), а также разработка программы для достоверного определения специфического и неспецифического связывания является основной задачей в данной работе.

В области биохимии и фармакологии, лиганд представляет собой вещество, которое образует комплекс с биомолекулами с определенной биологической целью сродства комплекса - белок-лиганд, где как правило формируется сигнал путем связывания с участком белка-мишени. Связывание обычно приводит к изменению конформации белка-мишени (Teif V.B., 2005; Teif V.B. & Rippe K., 2010). Отношения между лигандом и партнером по связыванию является функцией заряда, гидрофобности и молекулярной структуры. Связывание происходит на бесконечно малом интервале времени и пространства, поэтому константы скоростей, как правило, очень небольшие.

Связывание происходит за счет межмолекулярных сил, таких как ионные связи, водородные и связи ван-дер-Ваальса. Ассоциация стыковки фактически обратима путем диссоциации. Необратимое ковалентное связывания между молекулой лиганда и мишени является нетипичным в биологических системах. В отличие от определения лиганда в МОС-гидридной и неорганической химии, в области биохимии неоднозначны. Связывание лиганда может происходить также на металлическом участке, как это имеет место в гемоглобине. В целом, интерпретация связывания лиганда является контекстным в отношении того, что наблюдается в связывании.

Связывание лиганда с белком-рецептором приводит к изменению конформации химическим путем воздействия на ориентацию трехмерной формы. Конформация белка - рецептора характерна для функционального состояния. Лиганды могут включать субстраты, ингибиторы, активаторы и нейротрансмиттеры. Скорость связывания называется сродством, и это измерение показывает

тенденцию или силу эффекта. Связывание сродством актуализируется не только взаимодействием лиганд-белок, но и эффектом растворителя, которые могут играть доминирующую роль. Если имеет место нековалентное связывание в растворе, то растворитель обеспечивает химическую среду для лиганда и рецептора к адаптации, и, таким образом позволяет принимать или отклонять друг друга.

График Скетчарда представляет собой графический метод анализа данных равновесного связывания лиганда. Он используется для определения количества лиганд-связывающих сайтов на рецепторе, независимо от того, показывают ли эти сайты кооперативные взаимодействия, существует ли более одного класса сайтов, и сродством к каждому сайту.

Экспериментальными параметрами, используемыми для графика Скетчарда, являются концентрация свободного лиганда [L] и среднее число молекул лиганда, связанных с рецептором  $\bar{p}$ , при определенной концентрации лиганда в равновесии. Формальное определение  $\bar{p}$  есть

$$\bar{p} = \frac{\text{moles bound ligand}}{\text{moles receptor}} = \frac{\sum_{i=1}^n i[R_i]}{\sum_{i=0}^n [R_i]}$$

Где  $n$  - максимальное количество лигандов, которые могут связываться, и  $[R_i]$  представляет собой концентрацию рецепторного вида со связанными лигандами. В простейшем случае рецептора с одним классом невзаимодействующих участков связывание рецептор-лиганд следует уравнению Скетчарда.

Было признано несколько ограничений анализа Скетчарда. Один из них состоит в том, что  $\bar{p}$  и  $\bar{p} / [L]$  содержат экспериментальные ошибки, следовательно, вычисление наклона и пересечение линейного графика Скетчарда с помощью простых наименьших квадратов статистически не является достоверным. Лучшим подходом для статистического анализа является соответствие  $\bar{p}$  как функции [L] непосредственно уравнению для модели привязки. Кроме того, нелинейные графики Скетчарда, как известно, трудно интерпретировать. Анализ Скетчарда усиливает

известность данных связывания, полученных при низких концентрациях лиганда. Эти данные могут исказить экстраполяции к общему числу сайтов связывания, которые будут заполняться при концентрации насыщающего лиганда. Другой источник переинтерпретации связан с тем, что поведение привязки, совместимое с несколькими классами сайтов, также согласуется с другими моделями привязки. В случае многофазных графиков, для выявления истинных молекулярных свойств рецептора, необходимы независимые эксперименты в дополнение к анализу Скетчарда в качестве партнеров (Baron R. et al., 2010).

Взаимодействие большинства лигандов с их сайтами связывания могут быть охарактеризованы с точки зрения аффинности связывания. В целом, с высоким сродством связывания лиганда, результатами большой межмолекулярной силы между лигандом и его рецепторами при связывании с низким сродством включает меньше межмолекулярных сил. В общем, с высоким сродством связывания включает более длительное время пребывания лиганда при связывании с рецептором, чем в случае низкого сродства связывания. С высоким сродством связывания лигандов с рецепторами часто физиологически важны, когда некоторые из энергии связи могут использоваться, чтобы вызвать конформационные изменения в рецепторе, что приводит к измененному поведению ассоциированного ионного канала или фермента. Лиганды, которые могут связываться с рецептором, изменяют функции рецептора, и могут вызвать физиологическую реакцию, которая называется агонистом этого рецептора. Агонист связывания с рецептором, можно охарактеризовать как с точки зрения того, насколько физиологическая реакция может быть вызвана с точки зрения концентрации агониста, которая необходима для получения физиологической реакции. С высоким сродством связывания лиганда предполагает, что относительно низкая концентрация лиганда адекватна и максимально занимают лиганд-связывающий сайт и вызывает физиологическую реакцию. Чем ниже уровень  $K_i$ , тем более вероятно, что будет химическая реакция между ионом в ожидании и воспринимающим антигена.

С низким сродством связывания (высокий уровень  $K_i$ ) предполагает, что относительно высокая концентрация лиганда требуется до того, как участок связывания максимально заняты, при котором достигается физиологический ответ

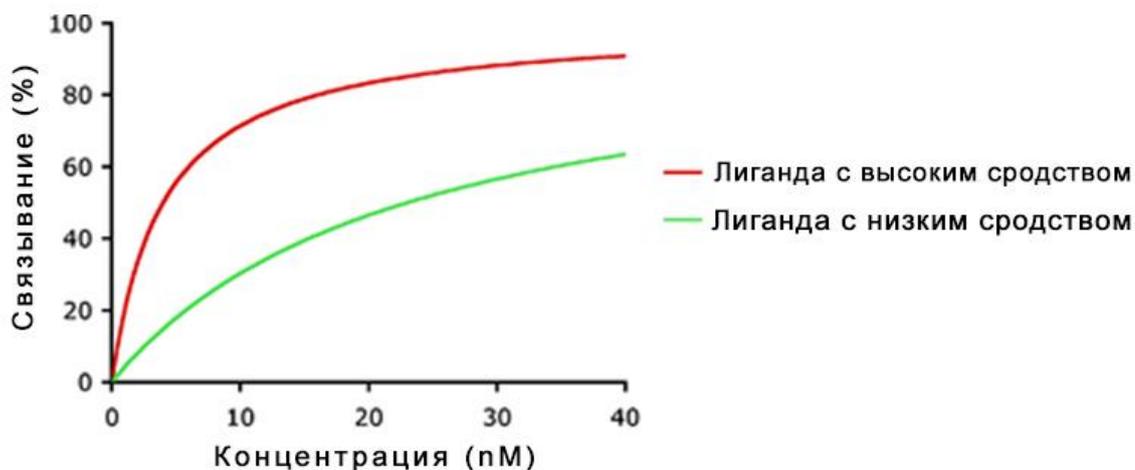
на лиганд. Два различных лиганда могут связаться с тем же сайтом связывания рецептора. Только один из агонистов может максимально стимулировать рецептор и, таким образом, может быть определен как полный агонист. Агонист, который может лишь частично активировать физиологические реакции, называется частичным агонистом. В этом примере, концентрация, при которой полный агонист (рис. 2, красная кривая) может максимально активировать рецептор составляет около  $5 \times 10^{-9}$  M. Лиганды, которые связываются с рецептором, но не активируют физиологические реакции являются антагонистами рецептора.

На примере, на рис. 1, лиганд-связывающие кривые показаны для двух лигандов с различными аффинности связывания. Связывание лиганда часто характеризуется с точки зрения концентрации лиганда, при которой половина рецептора занята сайтом связывания, известной как IC 50, которая связана отличной от константы диссоциации. В качестве лиганда иллюстрируется красной кривой имеет более высокую аффинность связывания и меньшим, чем Kd лиганда иллюстрируется зеленой кривой.

Если эти два лиганда присутствовали одновременно, большую часть верхнего аффинного лиганда будет связан с доступными рецепторными участками связывания. Это, как окись углерода, может конкурировать с кислородом в связывании с гемоглобином, что приводит к отравлению угарным газом.

Аффинность связывания наиболее часто определяется использованием радиоактивно меченого лиганда. Гомологичность конкурентного связывания эксперименты включают обязательную конкуренцию между меченым и немеченым лигандами. Методы применения немеченого лиганда, такие как поверхностного плазмонного резонанса, двойной поляризационной интерферометрии и многопараметрического поверхностного плазменного резонанса (SPR-MP) может количественно оценивать близость не только от анализов концентрации, но и от кинетики ассоциации и диссоциации. А в более поздних случаях конформационное изменение индуцируются только при связывании (Baaske P, et al., 2010). Этот метод позволяет определить аффинность связывания без какого-либо ограничения по молекулярной массе лигандов (Wienken C.J., et al. 2010). Применяют также

статистическую механику в количественном исследовании аффинности связывания лиганд-рецептор на функцию конфигурационного раздела (Vu-Quoc, L., 2008).



**Рис. 1.** Лиганд - связывающие кривые для двух лигандов с различным сродством связывания.

## 1.2. Панкреатит

Панкреатит – полиэтиологическое заболевание, сопровождающееся острыми осложнениями и высокой летальностью.

В связи с панкреатическим шоком находятся структурные и функциональные нарушения сердечной-сосудистой системы, центральной гемодинамики и микроциркуляции (Pezzilli R. et al., 1996; Widdison A.L. & Cunningham S., 1996; Kerner T. Et al., 1996). Электрофизиологические сдвиги свидетельствуют о развитии гипоксии и миокардиодистрофии вплоть до картины, характерного для инфаркта миокарда (Carrey L., 1975; Kim H.S., 2006). Помимо гипоксии, повреждающее влияние на миокард оказывает так называемый «миокард депрессирующий фактор» (МДФ) – октапептид, вырабатываемый ишемизированной поджелудочной железой при шоках различного происхождения и остром панкреатите. Параллельно с увеличением активности сывороточной амилазы происходит наращивание

содержания МДФ (Lefer A.M. et al., 1971; Lefer A. M. Spath A., 1974; Purcaru F. et al., 1997). В продукции МДФ важное место отводится протеиназам и лизосомальным гидролазам ПЖ (Lefer A.M. & Varenholz J., 1972). Клиническая картина ОП проявляется не только в виде повреждения поджелудочной железы, а сопровождается большим числом повреждений в организме благодаря высокому количеству, до 140 патогенных факторов, которые активизируются при ОП. Острый панкреатит сопровождается повышением уровня брадикинина и бета-эндорфинов, которые вызывают развитие гипотонии и депрессию миокарда. Бета-эндорфин образуется благодаря медиаторам трипсин-связанных ферментов, а брадикинин выделяется из гипофиза и вызывает угнетение гемодинамики при ОП (Satake K. et al., 1996).

В патогенезе острого панкреатита, кроме таких вышеупомянутых факторов, как активация протеаз, генерация свободных радикалов, высвобождение патогенных медиаторов, одна из главных ролей отводится ионам Ca. Кальций является критическим патогенным мессенджером в повреждении клетки. С помощью биохимических и гистологических методов исследования было доказано, что применение кальциевого блокатора – верапамила, можно защитить ПЖ от повреждающего церуелина (Zhou W. et al., 1996). Повышение концентрации  $Ca^{++}$  в цитозоле ацинарных клеток представляет собой возможный триггер для развития панкреатита (Willems P.H.-G.M. et al., 1993). Постоянный рост уровня  $Ca^{++}$  в клетке может быть обусловлен гипертонией, алкоголизмом, гипоксией, гиперкальциемией, вирусными инфекциями, действием различных лекарственных средств и т.д. (Ward J.B. et al., 1995; S. Gonzalez et al., 2016). Фактор некроза опухолей TNF-альфа вовлекается как один из вероятных медиаторов системного осложнения при ОП. Применение кальциевого блокатора – дилтиазема сопровождается снижением уровня TNF-альфа, а также улучшением биохимических и патологических критериев при ОП (Hughes C.B. et al., 1996).

Панкреатит-ассоциированный белок (ПАБ), который образуется в ацинарных клетках, появляется при ОП в панкреатическом соке и сыворотке крови. ПАБ ассоциирован не только с амилазой, но и С-реактивным белком, которые отражают патогенез ПЖ (Schmid S.W. et al., 1996; Schmid S.W. et al., 2010). Согласно

исследованиям других авторов, ПАБ ассоциирован не только с амилазой, но и С-реактивным белком, которые обнаруживаются особенно после трансплантации почек и четко отражают патогенез ПЖ (Schmid S.W., et al., 1996; Mandal A., 2017). Однако наиболее изученным является панкреастатин – пептид, состоящий из 49 аминокислотных остатков с глицинамидом у концевой карбоксильной группы, есть результат деградации хромогранина, выделяемый из поджелудочной железы свиньи (Tatemoto K., et al., 1986; Sherman S.K. et al., 2014). В островках панкреастатин локализован в инсулин-содержащих бета-клетках и глюкагон-содержащих альфа-клетках (Lamberts R., et al., 1990; Curry W.J. et al., 1991; Schmid M. C. et al., 2010). Представляет большой интерес тот факт, что рецепторы панкреастатина расположены на поверхности мембран гепатоцитов, причем связывание идет с высокой аффинностью ( $B_{max}$  15 фмоль/мг белка и  $K_d$  0,2нМ). Трансдукция сигнала рецепторов панкреастатина в клетках печени осуществляется через активацию фосфолипазы С, мобилизацию внутриклеточного  $Ca^{++}$  и его влияние на продукцию инозитол 1,4,5 – трифосфата.

Итак, панкреастатин взаимодействует со специфическими рецепторами на плазматической мембране, благодаря сопряженности с двумя различными G белками, путем активации фосфолипазы С. Являясь медиатором гликогенолиза в печени, он увеличивает концентрацию цитоплазматического свободного  $Ca^{++}$  и активирует протеинкиназу С. Однако, несмотря на наличие такой разносторонней и богатой информации об этом пептиде, роль панкреастатина в патогенезе ОП сегодня не полностью выяснена, однако его участие в онкологии, регуляции транслокации ионов кальция, что напрямую вызывает кардиологические нарушения, не представляет сомнений (O'Connor D.T. , 2005; Valicherla G.R. et al., 2013).

Инфаркт вызывающим фактором при ОП выступает «миокард депрессирующий фактор» (МДФ), который представляет собой октапептид, продуцируемый ишемизированным панкреасом и имеет следующую аминокислотную последовательность. - ***Gly.His.Gly.Gln.Glu.Val.Leu.Ile*** (Lefler A., 1972).

МДФ производится под действием протеолитических ферментов поджелудочной железы после ее ишемии. МДФ подавляет сократительную способность миокарда, сужает артерии и подавляет ретикулоэндотелиальную систему фагоцитоза. Несколько фармакологических агентов препятствует образованию МДФ в том числе мембранные стабилизаторы (например, глюкокортикоиды), ингибиторы протеазы (например, апротинин), простагландинов (например, PGE1 и PGI2), ингибиторы тромбоксан-синтетазы (например, имидазол, РТА 2) и действие местных анестетиков (например, лидокаин). Предупреждение образования МДФ или его действия улучшает выживаемость (Lefter A.M., 1972; 1982).

Исследованиями Симаворяна П.С. и Канаяна А.С. было показано, что эффект с снижении альфа-амилазной активности, которая при развитии некроза повышается в 8-10 раз, а следовательно и подавлению развития некротического повреждения миокарда, проявляет внутривенное введение 20-30 мл тиосульфата натрия. Являясь утвержденным фармакологическим комитетом СССР препаратом, не требующим специального разрешения на его применение, он неоднократно применялся в Институте хирургии МЗ Арм. ССР Микаеляном А.Л. и давал положительный результат. Активность альфа-амилазы снижался до интактного уровня через 12-15 часов (Симаворян П.С., 1973; Канаян А.С., 1984).

Разнообразие эндогенно образованных сосудосуживающих веществ циркулируют в крови и действуют в качестве посредников при ишемии и шоковых состояниях. Эти гуморальные вещества химически разнообразны и включают в себя пептиды, липиды и ароматические амины. Одним из новых пептидов, депрессанты (МДФ) и несколько интересных липидов, в том числе тромбоксана A2 (ТХА2), лейкотриена D4 (LTD4) и фактор активации тромбоцитов (PAF), являются очень сильнодействующими веществами, имеющие широкий профиль патофизиологических действий. Некоторые из эффектов МДФ включают депрессию миокарда, сужение сосудов висцеральных и ухудшение фагоцитоза. ТхА2, в первую очередь, сужает кровеносные сосуды, агрегаты тромбоцитов, а также повышает проницаемость мембран. LTD4 является сильным сосудосуживающим и способствует утечке жидкости из кровеносных сосудов. ФАТ активирует тромбоциты, угнетает функцию сердца, сужает дыхательные пути и улучшает утечки жидкости из

внутрисосудистого отсека. Таким образом, вазоконстрикция является общим для всех этих медиаторов. Кроме того, эти вещества имеют вазоактивные общие механизмы высвобождения и взаимодействуют для обострения ишемии и вносят свой вклад в патогенез множества шоковых состояний (Lefer A.M. & J. Martin, 1970; Lefer A.M., 1987).

### **1.3. Синдром длительного раздавливания**

Синдром длительного раздавливания (СДР) является сложным патологическим процессом, развивающимся при раздавливании мягких тканей в результате техногенных катастроф или природных катаклизмов. Патогенез СДР характеризуется общей интоксикацией организма с вовлечением всех органов и орган-систем, стрессом различной этиологии, гиповолемическим шоком, нарушением электролитного состава и обострением гиповолемического шока, вызванного NO-зависимой вазодилатацией капилляров в поврежденной мышце (Rubinstein I. et al., 1998; Michaelson M., 2009; Song J. et al., 2015). Особое место в патогенезе СДР занимает повреждение структуры и функции почек (Sever M.S. et al., 2004; Renal Disaster Relief Task Force, 2015), миоглобинурия (Kuyoumdjan J.A., et al., 2002), вымывание ионов калия и, наоборот, накопление ионов кальция, метаболический ацидоз и др. (Better O.S., 2011; Sigimura et al., 2002; Better O.S. & Abassi Z.A., 2011). Клиническая картина патогенеза СДР проявляется также резким повышением концентрации креатинина (Valdez C. et al., 2013), близкими корреляциями в сыворотке крови в содержании ионов калия и концентрацией креатинкиназы миоглобина с вовлечением системы NO (Kumar S.M. et al., 2001; Levy D. et al., 2002). Продолжительное раздавливание мягких тканей сопровождается активированием NO-синтетазной активности организма, что играет важную роль в его защите от нейротрансмиссии нервных сигналов и инфекций центральной и периферической нервной системы (Martinez A.M. & Canavaro S., 2002; Zavalkoff S., 2009).

Особое место при СДР занимает повреждение центральной нервной системы (ЦНС). Изучение мозга на экспериментальной модели СДР выявило серьезные

биохимические сдвиги и изменения морфологической картины структуры ткани мозга. Впервые на экспериментальной модели СДР показаны аналогичные нейродегенеративными нарушениями повреждения структуры мозга (Kevorkian G.A. et al., 2001; Guevorgyan A.G. et al., 2014).

Раздавливание седалищного нерва вызывает повышение уровня мРНК, иммуносупрессорного ИЛ-10, ИЛ-12 путем обратной транскрипции полимеразных реакций и сопровождается аутоиммунным невритом в раздавленных нервных конечностях, а также вызывает процесс Валерианы – дегенерации нервной ткани (Gillen C. et al., 1998; Walikonis R. & Poduslo J., 1998 a; 1998b; Menge T. Et al., 2001; Jander S. Et al., 2002; Barros T.E.P. et al., 2016). Весьма ощутимые сдвиги в содержании цАМФ, уровням активностей цАМФ-зависимой фосфодиэстеразы и аденилатциклазы, фосфокреатинкиназы обнаружены при раздавливании седалищного нерва. Так, сдавливание седалищного нерва приводит к понижению уровня цАМФ, который взаимосвязан с процессом де- и ремиелинизации Швановских клеток при СДР (Poduslo et al., 1995; Wu R. Et al., 2001; Jessen K.R. & Mirsky R., 2005), сопровождается трансформацией микроглии в цитотоксические клетки, вызывающие поражение ЦНС. Выявлено вовлечение  $Ca^{++}$ -независимой протеинкиназы C в процесс регенерации нервной системы (Kawano et al., 1997; Wang L. et al., 2013).

Поиски системного поражения организма с интоксикацией при остром панкреатите вывели нас на модель краш-синдрома, описанная в 1941 году английским врачом Биватерсом (Bywaters E.G., Beall D., 1941; Bywaters E.G.L., 1944; Kevorkian G., et al., 2006). Разработанная в «отделе патологической биохимии» Института биохимии НАН РА им. акад. Г. Бунятына экспериментальная модель краш-синдрома сопровождается острым повреждением миокарда и общей интоксикацией организма. Морфологическое изучение миокарда выявило типичное для инфаркта миокарда ишемическое повреждение ткани, в результате которого погибают животные, что нашло свое практическое подтверждение после землетрясения в Армении в 1988 году. Вызволненные из-под завалов пострадавшие погибали через 1-3 дня от острого инфаркта миокарда. Сравнения изученных биохимических сдвигов привели нас к обоснованному предположению, что в основе

повреждения миокарда и развития инфаркта лежит одинаковый с ОП механизм повреждения – это повреждение миокарда пептидами токсической природы.

1. ***Gly.His.Gly.Gln.Glu.Val.Leu.Ile.Arg.*** – 9 аминокислотных остатков
2. ***Lys.Lys.Gly.His.His.Glu.Ala.*** – 7 аминокислотных остатков
3. ***Arg.Lys.Asp.Met.Ala.*** – 5 аминокислотных остатков
4. ***Lys.Phe.Lys.His.*** – 4 аминокислотных остатка

Перечисленные пептиды являются результатом распада молекулы миоглобина, которая первым повреждается при раздавливании на многочисленные пептиды. В процессе раздавливания эти пептиды не обладают токсическим действием, и лишь в дальнейшем, в условиях отсутствия кислорода и при участии анаэробных микробов, которые интенсивно размножаются в раздавленной ране, постепенно приобретают токсические свойства. После снятия компрессии эти токсины попадают в кровяное русло и очень быстро распространяются по организму (Kevorkian G. et al., 2002). Остаток миоглобина, состоящий из 9 аминокислот, непроницаем для гематоэнцефалического барьера, однако этот пептид проходит его и оказывается в мозге, вызывая его повреждение наподобие нейродегенерации.

Было показано, что этот пептид, по пути «обратного захвата» (feed back) через нервные волокна, «вползает» в мозг (Guevorkian A.G. et al., 2011; Guevorkian A.G., 2014).

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Экспериментальный материал

Эксперименты ставились на беспородных крысах-самцах, весом 200-220 г.

Экспериментальный панкреатит вызывали охлаждением селезеночного сегмента поджелудочной железы хлорэтилом (Симаворян П.С., 1972). За сутки до воспроизведения панкреатита животные не получали пищи, однако имели свободный доступ к воде. Режим предварительного голодания обеспечивает стандартизацию условий опыта, а также способствует синхронизации секреторного цикла в экзокринных панкреоцитах с накоплением в их цитоплазме гранул зимогена. Течение острого панкреатита данной модели складывается из ряда последовательных стадий: отечной (5 мин. – 0.5 часа), геморрагической (1 – 6 часа), некротической (24 – 72 часа), репаративной (после 72 часов) и хронической рецидивирующей (21 сутки и далее) (Канаян А.С., 1984). Экспериментальный острый панкреатит сопровождается эндогенной интоксикацией, детерминирующий панкреатический шок. Животные декапитировали через 3, 24 и 72 часа после воспроизведения панкреатита. Исследования были проведены в следующих стадиях развития панкреатита: геморрагической (3 часа) и некротической – начало (24 часа) и конец (72 часа). Воспроизведение модели острого панкреатита и развитие его стадий контролировали морфологическими и энзиматическими (активность альфа-амилазы) методами. Некротическое повреждение миокарда и инфаркт вызывает октапептид продуцируемый ишемизированным панкреасом в кровь и названный «миокард депрессирующий фактор» (Lefter A., 1972).

Экспериментальный «синдром длительного раздавливания» или Краш-синдром вызывали путем раздавливания бедренной мышцы с силой раздавливания 100 кг/200 г белой крысы продолжительностью 2 и 5 часов с последующей декомпрессией в течение 2, 4, 24 и 48 часов (Kevorkian G.A., 1986; 2001).

В процессе компрессии интоксикация организма не прослеживается. Интоксикация начинает активизироваться и вызывает процессы токсического повреждения организма в период декомпрессии, когда рана, образовавшаяся в процессе компрессии, начинает выделять токсические пептиды в результате

анаэробного протеолиза мышечного белка – миоглобина. Начинается микробное заражение раны, которые также поступают в кровяное русло и распространяются по всему организму, вызывая токсикоз. Эти токсины вызывают повреждение почек, которые в свою очередь выбрасывают в кровь свои токсины, в частности бетта-амилоидный пептид, который проникает через гемато-энцефалический барьер, попадает в мозг и вызывает его нейродегенеративное повреждение.

Продуктами распада миоглобина зафиксированы нами были 4 пептида со следующей аминокислотной последовательностью:

1. ***Gly.His.Gly.Gln.Glu.Val.Leu.Ile.Arg.*** – 9 аминокислотных остатков
2. ***Lys.Lys.Gly.His.His.Glu.Ala.*** – 7 аминокислотных остатков
3. ***Arg.Lys.Asp.Met.Ala.*** – 5 аминокислотных остатков
4. ***Lys.Phe.Lys.His.*** – 4 аминокислотных остатка

Свойство «миокард депрессирующего фактора» проявляет пептид, состоящий из 9 аминокислотных остатков (Guevorgyan. A., 2014).

### **2.1.1. Получение митохондрий и саркоплазматического ретикулума**

После декапитации экспериментальных животных миокард промывали 0.15M раствором KCL, выдавливали через специальное приспособление для размельчения миокарда и гомогенизировали в 0.44 M сахарозе + 1 mM ЭДТА (pH 7.4). Гомогенат процеживали через 3 слоя марли. Полученные методом центрифугирования фракции митохондрий (10 000g / 15мин) и саркоплазматического ретикулума (30 000g / 35мин) были подвергнуты очистке в градиенте сахарозы. Чистоту фракций контролировали электронно-микроскопическим и энзиматическими методами. Моноаминоксидазу определяли по McCaman et al., 1965, цитохромоксидазу – по измерению степени поглощения кислорода при помощи электрода Кларка на кислородном анализаторе фирмы «Beckman», США, модель 0260 и  $Ca^{2+}$  - АТФаза (Meissner G. et al., 1973). Для предотвращения протеолитического расщепления белковых молекул применяли фенилметилсульфонил фторид (PMSF). Фракцию внутренних мембран,

митохондрий, получали путем их обработки дигитонином из расчета 1 мг дигитонина на 10 мг митохондриального белка. Суспензию митохондрий с дигитонином встряхивали на холоде 20 минут и центрифугировали при 40 000g / 15минут (Horrel C. & Cooper C., 1969). Осадок дважды промывали 0.5%-ным раствором дигитонина и немедленно осаждали при 105 000g / 30минут. Полученный осадок подвергали осмотическому шоку холодной дистиллированной водой и осаждали при тех же условиях.

Полученный осадок содержал вывернутые фрагменты внутренних мембран митохондрий (Чернух А.М. и Коптева Л.Л., 1977).

### **2.1.2. Обнаружение мембранных $Ca^{2+}$ - связывающих белков**

Обнаружение мембранных  $Ca^{2+}$  - связывающих белков проводили после электрофоретического фракционирования мембран на пластинках с 10% ПААГ, размером 20x20 см в присутствии додецилсульфата натрия и 8 М мочевины. Для предотвращения расползания низкомолекулярных фракций белков использовали пластину ПААГ толщиной 2 мм в верхней части и 4 мм в нижней. Разделение мембранных белков на фракции осуществляли по методу Вебера и Осборна (Weber K. & Osborn N., 1969) и Лемли (Laemmli U.K., 1970). Определение количества белка в каждой отдельной фракции проводили путем денситометрирования пластины ПААГ на лазерном денситометре «Biomed Instruments Inc.» (США) при длине волны 540 нм (область поглощения белков, окрашенных Кумасси - синим). Для определения подвижности белков на пластине 10% ПААГ использовали наборы определения Mr фирмы «Sigma» США. Величину сродства ионов кальция к мембранным белкам CP и M определяли на гзо-проточном счетчике Baerthold II.

### **2.1.3. Определение величины максимального связывания кальция ( $B_{max}$ ), константы диссоциации белков-лигандного комплекса ( $K_d$ ) и коэффициента корреляции кривой R.**

Суть метода заключается в построении концентрационной калибровочной кривой радиоактивного лиганда, по которой просчитываются опытные образцы. К стандартным пробам 3-й и 6-й концентрации  $^{45}Ca$  добавляется 100 мМ холодного  $Ca^{2+}$ , обеспечивающего неспецифический захват  $Ca^{2+}$ . Затем, по нулевой точке, а

также по значениям стандартных проб N°N° 3 и 6 строится калибровочная кривая неспецифического захвата радиоактивного лиганда. Просчитыванием опытных проб, результаты которых содержат и специфическое, и неспецифическое связывание, начинается расчет специфического связывания по кривой неспецифического захвата. Затем, по углу наклона  $\text{tg } \alpha$  концентрационной кривой высчитывается  $V_{\text{max}}$  и  $K_d$  для каждой серии проб, состоящих из трех повторностей. При величине коэффициента корреляции кривой менее 90% данные автоматически не считаются из-за низкой достоверности результатов.

Окончательные результатов соответствуют достоверности по величине

$$\delta_t = 92\%$$

Электрофорез для разделения мембранных белков митохондрий проводили на пластинках 20x20 см с 10% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия и 8 М мочевины по Weber K. & Osborn N. (1969) и Laemmli U.K. (1970).

## **2.2. Диалоговый компьютерный язык**

Сцинтилляционные спектрометры серии CG и SL-4200 (Roche Bioelektronique Kontron, France) снабжены обеспечивающим работу спектрометра микропроцессором, а также для компьютерной обработки результатов. Диалоговым языком такого микропроцессора является LEM II (LEM-II, Computer language, 1977; Vermunt, J.K., 1996a; 1996b; 1997).

LEM-II, являясь диалоговым компьютерным языком, использует символы аналогичные тем, которые используются в повседневной арифметике, в математических функциях и в человеческом языке. Специальные функции представлены в виде легко запоминающихся сокращений. Логика программы проста и понятна.

Программа записывается и хранится в памяти с помощью клавиатуры в режиме "Program mode". Каждая строка содержит одну или несколько команд. Все линии помечены и выполняются в числовом порядке их метки, с тех пор, как в

систему был введен режим "Execution mode". Порядковый номер строки или "метка" позволяет системе выполнять программу в желаемом порядке. Программа изначально написана так, чтобы две последовательные метки имели разницу 5 или 10 линий. Таким образом, дополнительные инструкции могут быть вставлены между двумя строками, которые уже существуют и в случае необходимости. Таким образом, это не является обязательным условием, чтобы переписать программу для освобождения места для новых строк, необходимость которых не была очевидна изначально.

В дополнение к проведению математических операций, LEM позволяет пользователю контролировать спектрометр для операций над строкой. Он имеет полную команду над спектрометром, обеспечивает заранее смены образцов и внешних стандартных функций. Эти функции могут быть инициированы в любом порядке и повторены любое количество раз. Используя различные принтеры и их клавиатуры, бумажные или магнитные считыватели лент, пользователь имеет возможность вводить информацию, а потом распечатать вычисленные результаты на принтере. Он может заставить систему напечатать сообщения, заголовки, графики и представлять данные в любом формате, совместимые с механикой и управлением принтера. При необходимости, данные также могут быть напечатаны на бумаге или записаны на магнитной ленте для дальнейшей обработки. Имеется возможность программирование различных программ для последующей обработки результатов, построение калибровочных кривых, не имеющих общего с измерением радиоактивности, однако позволяющий обработать данные содержания радиоактивности в каждом образце или серии образцов, на основе разработанной и внесенной в спектрометр программы для дальнейших расчетов.

Так, подсчет программы по специфическому и не специфическому связыванию радиолиганда в графиках Скетчарда с высокой эффективностью и точностью, а именно с процентом корреляции графиков и полученных результатов с точностью 90%, является основной задачей данной диссертационной работы. Для выполнения поставленных задач по специфическому, неспецифическому связыванию радиолиганда, расчета точек максимального связывания, константы

диссоциации лиганд-рецепторного комплекса рассматривается в разделе «собственные исследования».

Ниже приведен пример простой программы:

Строка	Метка	Инструкция
	┌	10DEX
	└	20DST
	—	30A=CA/TM,B=CB/TM
		40W_Nø,TM,A,B,EX/
		50AVN
		60G_10

В данном руководстве ø символ инструкции представляет букву "O", а \_ представляет собой пробел. Ноль представлена символом 0.

#### Порядок выполнения и трактовка:

Строка 10 – Подъемник находится в нижнем положении, применяется метод внешней стандартизации, коэффициент загрузки в регистре EX.

Строка 20 - Начало подсчета и остановка при достижении условия передней панели. Загрузка примерного образца в регистре Nø, загрузка времени в регистр TM и отсчет каналов A, B и C в регистры CA, CB и CC соответственно.

Строка 30 - Разделить данные из канала A на время и установить результаты в регистр A (CPM-A). Разделить данные из канала B на время и установить результаты в регистр B (CPM-B).

Строка 40 - Запись (печать) номера, времени, CPM-A, CPM-B, и внешнего стандартного коэффициента. Затем возврат печатающей головки налево и продвижение бумаги на одну строчку.

Строка 50 – Продвижение бумаги до следующего образца.

Строка 60 – Возврат к строчке 10 и повтор процесса для следующего образца.

Строки команд выполняются в порядке их меток. Например, они могли бы быть помечены 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 2, 4, 6, 8, 10, 12 и т.д.

Предусмотрены случаи, когда пользователь может сообщить системе, когда она должна запоминать новую программу или когда она должна выполнить ту, которая уже в памяти. После того, как программа вводится в память с клавиатуры, она может выводиться на бумагу или магнитную ленту, из которой она может быть прочитана обратно в компьютер. Таким образом, библиотеки программ могут быть сделаны для быстрого автоматического ввода без ошибок.

LEM-II содержит еще одну специальную функцию ПЕРЕДНИЙ / ФОНОВЫЙ (FOREGROUND/BACKGROUND (F/B)). С практической точки зрения, П / Ф работает так же, как РАЗДЕЛИТЕЛЬ ВРЕМЕНИ. С компьютеризированных счетчиков CG и SL-4200, компьютер может быть использован для обработки данных по строке от счетчика по заданной программе в Переднем плане и одновременно обрабатывать данные введенные с клавиатуры или с магнитного носителя другой программой в фоновом режиме.

Во время распечатки оба принтера могут работать одновременно и независимо друг от друга. Передние и Фоновые программы и их регистры полностью независимы. Другими словами, каждый из них имеет свой собственный набор алфавитных регистров от А до Z и их собственный набор индексированных регистров M и Z. Путаница при этом исключается. Кроме того, подсчет ленты с бумаги, могут совместно использоваться обоими.

Оператор в Фоновом режиме может вводить команды, а в это время счетчик Переднего плана вычисляет результаты. Программы могут быть написаны или введены одновременно для Переднего плана и Фона.

Это, как если бы два независимых компьютера были доступны все время. Когда лента языка LEM-II, изначально введенная в память, пользователь решает, сколько памяти выделить для Переднего плана и Фона и сообщает системе, какие периферийные устройства и счетчики подключены, и система готова к приему программ.

### **2.2.1. Этапы работы с программой LEM II**

В режиме Background/Foreground, программы, независимые от выполненных на счетчике операций в режиме on/line, могут быть записаны и выполнены через второе

устройство ввода/вывода, такой как Телетайп. Также возможно, чтоб и Background/Foreground программы, которые выполняются для операций над строкой, не имеют никаких отношений к счетчику. Фоновой процесс предусмотрен специально для off-line операций, и непосредственно от счетчика никакой информации невозможно получить. Необходимо использовать данные с перфоленты, магнитной ленты или ввода с клавиатуры. Правила написания и выполнения программ в Фоновом режиме идентичны тем, которые применяются и для Переднего плана. Передний режим считается нормальным режимом работы и, все правила, объясненные выше, относятся и к Background и Foreground.

### **2.2.2. Режимы работы**

Фоновая система имеет три режима работы так же, как BACKGROUND – DIRECT – PROGRAM – EXECUTION.

Между Background / Foreground системами возможна любая комбинация режимов. Передняя система может выполняться в то время как BACKGROUND находится в режиме PROGRAM. BACKGROUND может использовать DIRECT режим в то время как Передняя находится в режиме PROGRAM и так далее.

### **2.2.3. Операционная взаимосвязь между BACKGROUND режимом и FOREGROUND**

BACKGROUND и FOREGROUND режим являются независимыми во всех отношениях. Тем не менее, данные могут передаваться между ними. Background и Foreground режимы имеют независимые регистры, даже если мнемоника для регистров идентична. Это правило относится и к индексированным регистрам M и Z и их индексам. Эти режимы имеют свои собственные независимые принтеры (например Телетайпы). В Background/ Foreground режиме основной принтер назначается к Background режиму, а вспомогательный принтер назначается к Foreground во время диалога конфигурации LEM-II. Дополнительный принтер может быть временно назначен к Переднему режиму только для вывода, введя E, затем нажимая клавишу возврата, когда Foreground система находится в режиме Direct.

Номера периферийных устройств, которые используются для работы вспомогательного принтера от Background системы 2 для печати и 3 для печати и перфорации. Считыватель не может воспользоваться командой LEM. Чтобы восстановить управление Foreground режима, используйте прерывание CTRL I на вспомогательном телетайпе. Номера периферийных (I/O) устройств идентичны для Background и Foreground режима по отношению к Ввод/Вывод инструкциям Output, Program, Read и Write. Например, W\_1, распечатает и перфорирует информацию на телетайпе Background режима, если команда выполняется в программе Background режима. Если та же команда выполняется в программе Foreground режима, это приведет тому, что данные будут напечатаны на вспомогательном Телетайпе присвоенному к Foreground. Для всех практических целей функции Background и Foreground системы выполняются одновременно, независимо от того, в каком режиме работы они используются. Настолько, насколько пользователь обеспокоен, система будет работать в режиме TIME SHARE. Например, принтеры и их считыватели могут работать одновременно. Тем не менее, режим Background имеет приоритет, чтобы не задерживать счетчик по какой-либо причине. Foreground программы выполняются во время ожидания Переднего режима (в то время как счетчик аккумулирует счет или во время работы принтера Background режима). Поэтому время выполнения сложных операций в режиме Foreground может показаться несколько медленнее, чем для операций режима Background, но в целом этот результат незначительный. Единственным исключением может быть во время продвижения смены образца.

Режим Foreground не может выполнять или отвечать на команды с клавиатуры, в то время как на переключателе или внешнем источнике осуществляется всякие механические действия. Тем не менее, общий интервал времени для механических операций, как правило, составляет всего от нескольких секунд до 10 минут.

#### **2.2.4. Быстрый считыватель перфоленты**

Быстрый считыватель используется совместно как в режиме Background, так и Foreground. Инструкция R\_2, выполненная в обоих режимах, приведет к считыванию

информации с магнитной ленты, которые будут введены в регистры, назначенные как соответствующие инструкции Background и Foreground режимов.

#### **2.2.5. Назначение памяти**

Когда интерпретатор LEM-II изначально введен в память, пользователь может решить, сколько памяти выделять для обмена между режимам Background и Foreground. После того, как память распределена, ситуация не меняется. Для того, чтобы перераспределить память, интерпретатор должен быть перезагружен. Общий объем памяти, доступный как для Переднего и Фонового режимов, составляет около 300 байт меньше, чем в режиме "только Foreground ", потому что память должна быть зарезервирована для контроля функций в режиме Direct в обоих (Передней и Foreground) системах. Кроме того, дополнительные фиксированные регистры для режима Foreground требуют больше памяти.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Диалоговая программа Скетчарда для расчета специфического и неспецифического связывания.

Используя радиоактивный  $^{45}\text{CaCl}_2$ , проводили изучение связывание радиолиганда с мембранными белками саркоплазматического ретикулума (СР) и белками внутренних мембран митохондрий (М) миокарда в норме и после некротического повреждения. Экспериментальными моделями повреждения миокарда были отобраны модели острого панкреатита (ОП) и «синдрома длительного раздавливания» или Краш-синдром (Kevorkian G.A. et al. 2002).

В главах «литературный обзор» и «методы исследования» диссертационной работы были подробно изложены биохимические параметры повреждения миокарда в условиях *in vivo*.

Особое место в изучении повреждения миокарда, вплоть до гибели экспериментальных животных, заняло изучение сродства (аффинность) кальция к мембранным белкам СР и М на экспериментальных моделях белых крыс с ОП и СДР. На фоне повреждения миокарда использовали естественный биологически активный цитокин «пролином богатый пептид» (ПБП).

Изучения аффинности мембранных белков к ионам кальция проводили в координатах Скетчарда (Scatchard G., 1949).

Программа состоит из отдельных чередующихся блоков.

Блок В Main, самый большой по объёму составлен для счета радиоактивности. Так, считываемые образцы, содержащие  $^{45}\text{Ca}$ , который имеет бета/минус/распад, дают значения импульс/мин, т.е. относительную радиоактивность. Для сопоставления данных необходим пересчет их значений в распады/мин (абсолютная радиоактивность), т.к. только эти значения сопоставимы. Каждый радионуклид, в зависимости от энергии бета/минус распада, регистрируется

с разной эффективностью. Радиоактивный  $^{45}\text{Ca}$  регистрируется с эффективностью 92-95%. Следовательно, для получения значения абсолютной радиоактивности, необходимо разделить имп/мин на эффективность счета, который подсчитывается методом «внешней стандартизации», благодаря заложенными в блок В Main, данными калибровочной кривой. В результате получаются сопоставимые результаты всей группы образцов. Далее, в блоках В LOMA и В SOLV эти результаты группируются в соответствии с поставленной задачей.

Затем, рассортированные по группам значения переходят в блок В PROG, где происходит окончательная сортировка по группам, и данные переходят в блок В TAPE, который выдает первоначальные результаты на принтер для распечатки. После распечатки результатов абсолютной радиоактивности каждого отдельного образца (расп/мин), все результаты переходят в блок В SCET.

Для работы в В SCET необходимо подготовить следующие образцы:

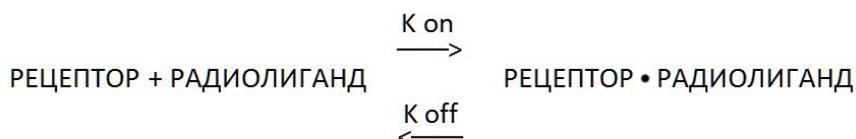
1. Все пробы готовятся триплетом. Так, первые 6 триплета – это калибровочные пробы по концентрации. Они готовятся для всей серии.
2. Затем следуют 8 триплетов – 1 и 2 триплеты содержат исследуемый образец (в нашем случае мембранный белок CP или M), радиолиганд ( $^{45}\text{CaCl}_2$ ) и «холодный», нерадиоактивный  $\text{CaCl}_2$  в концентрации 10-100 мМ. Концентрация добавленного  $^{45}\text{CaCl}_2$  должна лежать в пределах 0,1-0,01 микроМ, и их концентрации должны соответствовать 3-ей и 6-ой концентрациям на калибровочной кривой. Эти две концентрации калибровочной кривой выражают результаты неспецифического связывания.
3. Следующие 6 триплета, по одному триплету на точку с разными концентрациями радиолиганда, составляют исследование специфического и неспецифического связывания.

Радиолигандом является радиоактивно меченный препарат, который можно связать с рецептором, транспортером, ферментами или другими биологическими структурами. Измерение скорости и степени связывания предоставляет информацию о количестве сайтов связывания, их близость и доступность для различных препаратов. Связывания радиолиганда могут быть использованы для характеристики рецепторов в их естественной среде или трансформироваться в

клеточных линиях, для динамического исследования рецепторов и их локализации, идентификации новых химических структур, которые взаимодействуют с рецепторами, а также определить активность лиганда и селективность в нормальных и пораженных тканях. Рецепторы в тканях существуют в очень малых концентрациях.

Наиболее распространенным способом обнаружения рецепторов в мембранных препаратах, срезах тканей в очищенной форме является метод Скетчарда, использующий радиоактивный препарат, который обладает высоким сродством и высокой степенью селективности. Для получения достоверных результатов, необходимо инкубировать ткани с радиоактивными препаратами при соответствующих условиях эксперимента, когда радиоактивный препарат (РП) будет связываться с рецептором (Р) с образованием лиганд-рецепторного (ЛР) комплекса, сохраняя понятие «закона действия масс» (Katsumata M. , et al., 1979).

Закон действия масс



$$\text{Равновесие} \frac{[\text{Лиганд}] \cdot [\text{Рецептор}]}{[\text{Лиганд} \cdot \text{Рецептор}]} = \frac{\text{K off}}{\text{K on}} = \text{Kd} ,$$

где

K off — константа скорости диссоциации ,

K on — константа скорости ассоциации ,

Kd — константа диссоциации лиганд-рецепторного комплекса .

Разработанная в рамках настоящей диссертационной работы программа для изучения параметров аффинности мембранных белков CP и M к ионам кальция, разработана для работы в координатах Скетчарда с достоверность корреляции 92%. Такая достоверность полученных результатов считается самой высокой. Если в исследуемых образцах из триплета выпадает и выбраковывается один образец, то это значение не учитывается, и данный результат подсчитывается по двум образцам.

По нулевой, третьей и шестой концентрациям неспецифического связывания (NSB- nonspecific bound) строится кривая неспецифического связывания и подсчитывается коэффициент корреляции. Если это значение меньше 90%, то рядом с результатом распечатывается !!!!! (5 восклицательных знака). В продолжении, для каждой концентрации рассчитывается NSB, после чего берутся результаты 6 триплетов, высчитываются значения NSB, и получается кривая специфического связывания.

В нашем случае, для считывания связывания радиолиганда с мембранными белками саркоплазматического ретикулума (СР), использовали сцинтилляционный спектрометр SL-4221 (Roche-Bioelectronique Kontron, France), снабженный встроенным микропроцессором с рабочим «языком» LEM-II, который представляет собой разговорный программный язык. Это означает, что он использует символы, из повседневных математических и арифметических функций, а также разговорного языка. Некоторые функции для легкости обозначены в виде аббревиатур. После составления, программа хранится в памяти с помощью строчки "Program mode", которая находится на клавиатуре принтера. Каждая строчка имеет возможность выполнять одну или несколько команд. Как только система запускается (Execution mode), строчки маркируются, и их функции начинают выполняться по очереди. Порядковый номер строчки (label) дает возможность системе выполнять функции в любой последовательности. Обычно программа изначально составляется таким образом, чтобы между двумя последующими строчками разница составляла 5 или 10 свободных порядковых номеров, чтобы, при необходимости, добавить между строчками новые инструкции, которые в программе не рассматривались, но позже могут понадобиться.

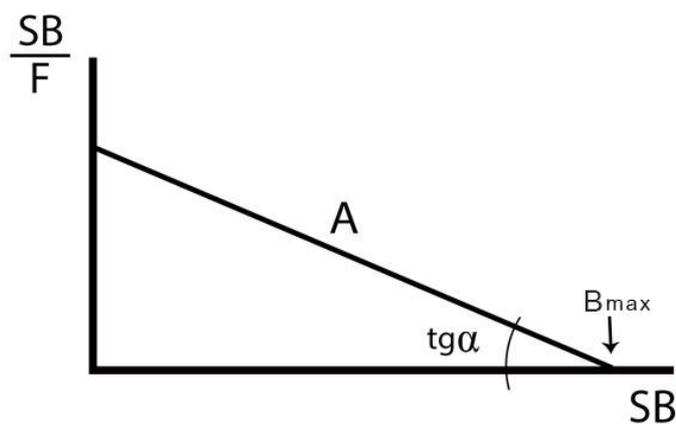
В дополнение к выполненным математическим операциям, LEM позволяет пользователю контролировать on-line операции спектрометра, давая полноценный контроль над спектрометром, образцами изменений и стандартными функциями. Эти функции могут быть введены в любом порядке, повторяться любое количество раз и в любых комбинациях.

Метод Скетчарда состоит в определении специфического связывания радиолиганда, для чего отбираются 6 триплетов, содержащих только

радиоактивный лиганд в 6 концентрациях для построения калибровочной кривой. После чего готовят 8 образцов-триплетов, где первые 2 образца содержат нерадиоактивный – «холодный» лиганд, инкубационную среду, радиоактивный лиганд и исследуемый биологический образец, в данном случае «вывернутый» саркоплазматический ретикулум или внутренние мембраны митохондрий. Специальная обработка CP и M и получение «вывернутых» органелл позволяет открыть доступ радиолиганда к рецепторам CP по отношению к данному лиганду, в нашем случае к  $^{45}\text{CaCl}_2$ . Присутствие в исследуемом образце «холодного» и радиоактивного лиганда определяет неспецифическое связывание, соответствующее 3-й и 6-й точкам на калибровочной (по концентрации) кривой.

Остальные 6 триплетов, отдельно по одному триплету на каждую точку, дают суммарный результат по специфическому и неспецифическому связыванию. Программа разработана по принципу выбраковки результатов, отличных на 10%, после чего продолжают считать по среднему значению от дуплета, и дальнейшие расчеты ведутся от средних значений дуплексов. По 0, 3 и 6 концентрациям строится кривая неспецифического значения и рассчитывается коэффициент корреляции кривой. Если это значение составляет менее 92%, то машина распечатывает !!!!! о предупреждении возможной ошибки. После чего продолжается считывание значения неспецифического связывания. Из оставшихся 6 триплетов высчитываются значения неспецифического связывания. Продолжая расчеты, машина автоматически рассчитывает  $F=G-SB$ , где  $G$  – значения калибровки первых шести концентраций, а  $SB$  – значения специфического связывания. После чего считывается  $SB/F$  и распечатываются 6 пар значений для  $SB$  (специфическое связывание) и  $SB/F$ , где  $F$  – концентрация не связавшегося лиганда.

Затем строится прямая (или прямая с разломом, если точки связывания бывают более одной) и по наклону угла  $\text{tg}\alpha$  вычисляется специфическое связывание – точка пересечения  $A$  ( $BM$  – специфическое связывание) и  $Kd$  – константа диссоциации (рис. 2).



**Рис. 2.** Рабочая кривая Скетчарда, по которой считываются специфическое связывание и коэффициент корреляции.

Эти две величины,  $B_M$  и  $K_d$ , являются искомыми величинами эксперимента. После чего поочередно исключаются каждая из 6 точек и снова считываются данные, но без одной точки. Тем самым, по 5 точкам рассчитывается коэффициент корреляции. Если значение коэффициента корреляции меньше 92%, то результаты эксперимента считаются по двум точкам одинаковой концентрации. Если же результаты эксперимента не соответствуют 92% корреляции, то эксперимент считается статистически недостоверным.

Полученные результаты выдаются в виде таблицы, в которой указаны  $B_{max}$  – величина связавшегося лиганда ( $nM \text{ ligand} \cdot mg^{-1} \text{ protein}$ ) в точках с низким сродством (low affinity) и в центре с высоким сродством (high affinity), величина константы диссоциации лиганд - рецепторного комплекса –  $K_d$  ( $nmol \text{ ligand} \cdot mg^{-1} \text{ protein}$ ). Константа диссоциации –  $K_d$ , указывает на величину того количества радиолиганда, которая в процессе образования и диссоциации комплекса остается всегда стабильно связанным.

Связывание радиолиганда с рецептором может быть как специфическим, так и неспецифическим. Неспецифическое связывание может представлять несколько явлений. Так, в большинстве случаев, основная часть неспецифического связывания представляет собой взаимодействие лиганда с мембранами. Молекулярные детали неясны, но неспецифическое связывание зависит от заряда и гидрофобности лиганда. Второе - неспецифическое связывание может быть также связывания с

рецепторами, переносчиками и другими белками, которые не представляют интереса для исследователя и которые можно считать неспецифическими.

Неспецифическое связывание обнаруживается путем измерения связывания радиолиганда в присутствии насыщенной концентрации немеченого лиганда, который связывается с рецепторами. В этих условиях, практически все рецепторы заняты намеченным препаратом, и радиолиганд может связываться только с неспецифическими сайтами. Необходимо произвести вычитание неспецифического связывания в определенной концентрации радиолиганда от общего связывания в этой концентрации, чтобы подсчитать специфическую связывания радиолиганда с рецепторами.

Какой немеченый препарат следует использовать для определения неспецифического связывания? Очевидным является использование того же соединения, что и радиолиганд, но в его немеченой форме. Во многих случаях это необходимо, так как другой препарат не может связаться с теми же рецепторами.

Какую концентрацию немеченого лиганда следует использовать? Необходимо использовать достаточное количество, чтобы блокировать связывание практически всех специфических сайтов радиолиганда, но не так много, что может привести к общим физическим изменениям в мембране, которые могут изменить связывание. Если исследуется хорошо охарактеризованный рецептор, необходимо использовать немеченый лиганд в концентрации, превышающей в 100 раз выше концентрация радиоактивного лиганда. Если неспецифическое связывание составляет более половины концентрации специфического связывания, то полученные данные не будут отличаться высокой достоверностью.

Ввод данных в блок В SCET происходит через блок В INPUT.

Рабочая программа для расчета величины специфического связывания по графикам Скетчарда составлена для работы с радиолигандами на сцинтилляционных спектрометрах, а в конкретном случае - на жидкостном сцинтилляционном спектрометре SL-4221 (Roche-Bioelectronique, France), и состоит из следующих блоков:

Считывание результатов уровня радиоактивности протекает в следующей последовательности: сначала считывается относительная радиоактивность

(импульс/мин), затем эти результаты пересчитываются в абсолютную радиоактивность (распад/мин), необходимую для достоверного сопоставления одних результатов с другими. Только после начальной обработки результатов данные проходят по остальным блокам и окончательно распечатываются в следующем виде:

Экспериментальные группы	$V_{max}$ , нмоль кальция $\times$ мг <sup>-1</sup> белка		$K_d$ , нМ кальция $\times$ мг <sup>-1</sup> белка	
	Центр с низким средством	Центр с высоким средством	Центр с низким средством	Центр с высоким средством

Создание программы машинной обработки результатов специфического и неспецифического связывания лиганда с рецептором, а также, определение константы диссоциации лиганд-рецепторного комплекса, дают возможность для широкого изучения процессов действия медицинских препаратов, изучения свойств новых препаратов, экспериментального исследования развития патологий различных этиологий, а также выбора наиболее эффективных методов лечения.

Разработанная программа допускает также построение гистограммы по результатам эксперимента.

### 3.2. Программа работы сцинтилляционного спектрометра SL-4221 с автоматическим расчетом специфического связывания в координатах Скетчарда.

#### Блок В MAIN

1 Z=1,G 10

2 Z=2,G 10

3 Z=3,G 10

4 Z=4,G 10

5 Z=5,G 10

6 Z=6,G 10

7 Z=7,G 10  
8 Z=8,G 10  
9 Z=9  
10 I Z3 =0,G 61  
16 Z7=17 9,C SOLV  
17 I Z2>20, G 40  
18 I=Z2-1\*7+52,J=215  
20 I=I+1,J=J-6,MI=MJ  
22 D 4,20  
23 K=5,J=6  
24 I=I-6,MI=MK,I=I+1,MI=MJ  
25 W ,/  
26 W 1<,"CRV#"2\*Z2/  
28 W 1,"LL="-----",OL="6\*MJ",  
29 W ,/8\*@"A"12\*@"B"12\*@"C"12\*@"D"12\*@"E"/  
30 I=I+1,W 1,3\*@"MI",  
32 D 4,30  
34 W 1>  
36 G 62  
40 Z7="09,C SOLV  
42 I=Z2-21\*19+115,J=245  
44 C 20,26  
46 I=1+5,J=215  
48 D 5,20  
49 C 23  
50 I=I-10,C 26  
51 W ," ISO 2-B"/  
52 C 28,34  
54 W ,/"ISO 2-A"  
56 C 29,34  
57 I=I+2,W,/"ISO 1-A"/

58 K=17,J=18  
 59 C 28,36  
 60 G 62  
 61 C 671,685  
 62 Z9=1,Z5=LY,I=Z-1\*3+20,J=1,I LY=0,TM=0,G 82  
 76 I=I+1,J=J+1,ZJ=ZI,I J=3,ZI=0  
 80 D 2,76  
 82 W,/'PROG#'2\*Z@@''LY='1\*Z5@@''CRV #'2\*Z2/  
 84 I LY=0,Z4=0,G 235  
 86 Z11=NO/100,N Z6,Z10  
 90 I=2  
 92 I=I+1,MI=0  
 94 D 20,92  
 96 M5=100,M17=100  
 100 I=Z-J\*2+31,M1=MI,I=I+1,M2=MI  
 102 I Z5=7,N Z2,Z3  
 104 I Z2=0,G 144  
 112 I Z3>0,G 144  
 120 I Z2-24\*3+171  
 122 I Z2>23,MI I=MI,I=I+1,M16=MI,I=I+1,M23=MI,G 144  
 125 I Z2>20,G 140  
 130 I=Z2-1\*7+50,J=4  
 132 I=I+1,J=J+1,MJ=MI  
 134 D 6,132  
 136 G 144  
 140 I=Z2-21\*19+113,J=4  
 142 D 19,132  
 144 I=179  
 146 D 100,92  
 150 N=Z5,W,/'SPL # TIME'5\*@"CPM"  
 152 I N=1,W , "A"

154 I N=2,W ,"B"  
 156 I N=3,W ,"C"  
 158 I N=4,W ,"A"5\*@"CPM B"  
 159 I N>4,I N<7,W ,"B"  
 160 I N<7,W ,5\*@  
 162 I N>3,I N<7,W ,"CPM C"5\*@"C/B"6\*@"  
 164 I N<4,W ,"ESR"6\*@"EFF"6\*@"  
 166 I N>7,W ,"A"5\*@"CPM B"5\*@"  
 168 I N=8,W ,"ESR"6\*@"  
 170 I N=7,W ,"C"  
 180 I Z2=0,G 194  
 182 I Z3>0,G 190  
 184 I Z2<10,W ,"DPM"  
 185 C 152,158  
 186 I N>3,I N<7,N=N-3,C ---  
 187 I Z2>20,W ,"DPM A DPM B"  
 188 G 194  
 190 I Z2<10,W ,"EFF"  
 191 C 185,187  
 192 I Z2>20,W ,"EFF A EFF B"  
 194 W ,/  
 200 I Z5<4,G 208  
 204 I Z5=8,G 208  
 206 G 220  
 208 DEX  
 210 R=EX,X=EX\*10,I R=0,TM=0,G 235  
 220 DST :  
 235 S=NO/100.,I TM>0,Z10=Z10+1,G 260  
 242 W ,/5\*S" SKIP SPL"  
 244 I Z3>0,Z4=0,I=Z-1\*3+22,ZI=Z3,Z3=0,G 250  
 246 I Z4>0,Z6=Z6+1

248 I Z5>0,G 580  
250 W ,”& GRP”  
252 AVN  
254 G 252  
260 A=CA/TM-SA,B=CB/TM-SB,C=CC/TM-SC  
262 N=Z5,I N>3,I N<7,X=0,R=0,I B>0,R=C/B,X=R\*10  
270 W ,/  
271 K=5,I S<10,K=4,W ,@  
272 W ,K\*S@ @5\*TM3\*@  
276 I N=1,F=A  
278 I N=2,F=B  
280 I N=3,F=C  
282 I N>3,I N<7,N=N-3,C 276,288  
290 N=Z5,I N<5, W ,7\*F3\*@  
292 I N>3,I N<7,W ,7  
294 I N>7,C 332  
296 I N<7,C 331  
297 I N=8,C 331  
298 I N=7,F=C,W ,7\*C  
300 I Z2=0,G 550  
305 I Z3=0,G 450  
310 I Z2>20, G 335  
312 C 23  
313 I R<MK,MK=R  
314 I R>MJ,MJ=R  
315 E=F/M1  
320 W ,7\*E3\*@  
325 Z7=179,C LOMA  
330 G 572  
331 W ,6\*R3\*@  
332 W ,7\*A3\*@7\*B3\*@

335 I Z2>23,G 375  
340 I Z9=2,G 355  
345 E=A/M1,C 320,330  
346 C 58  
347 C 313,315  
350 G  
355 E=A/M2,F=B/M2,C 320  
357 C 325  
360 E=F,Z7=209,C 320  
365 C LOMA  
367 C 312,315  
370 G 572  
375 K=S-INTS\*100, - K=1,L=A/M1,M23=E,C 320  
380 I K=1,G 580  
382 C 120  
385 C 355  
387 W ,7\*F  
390 MI=F,I=I+1,MI=E,I=I+1,MI=M23,M11=F,M16=E,Z3=0  
400 C 25,28  
405 W ,"EFF 12-B 12-A"8\*@ " I1-A"/  
410 W ,1,8\*F", "8\*E", "8\*M23",",>  
412 W ,//  
413 C 150,170  
414 C 187,2  
415 G 580  
450 I Z2>20,G 480  
452 I=7  
455 E=MI  
460 I=I+1,E=E\*X+MI  
462 D 3,460  
464 F=F/E,W ,6\*E3\*@7\*F

466  $I=0, C 23$   
 468  $I R < MK, I=1, W, "<"$   
 470  $I R > MJ, I=1, W, ">"$   
 475 G 550  
 480 C 452,464  
 482  $B=B/E, I=12, C 455,464$   
 486  $A=-B * E+A, I=19, C 455,464$   
 490  $A=A/E, C 332$   
 500  $I Z2 > 23, G 550$   
 505  $I=0, C 58$   
 506 C 468,475  
 510  $I I=0, W, "*"$   
 515 C 466,475  
 520 C 510  
 550  $I Z4=0, G 572$   
 555  $Z6=Z6+1, I=179+Z6, 1 Z5 < 8, MI=F, I F > M3, M3=F$   
 517  $I Z5 < 8, G 580$   
 560  $I=I+Z6, MI=B, I=I-1, MI=A, I A > M3, M3=A$   
 564  $I B > M4, M4=B$   
 576  $I Z10 > 1, W, /$   
 580 AVN  
 585  $Z10=0, N=NO/100, I N=Z11, G 200$   
 590  $Z9=Z9+1, Z11=N$   
 592  $I Z3 > 0, G 605$   
 595 G 150  
 605  $Z7=179, C SOLV$   
 610  $I Z2 > 20, G 635$   
 615  $Z3=0, C 18,36$   
 630 G 130  
 635  $I Z9 > 2, G 660$   
 640  $I=Z2-21 * 19+127, J=215$

645 D 5,20  
650 K=1 7,J=18,C 24  
655 G 144  
660 Z7=209,C SOLV  
665 C 42,60  
670 Z3=0,G 140  
675 I Z4=1,C HIST  
677 I Z4 SCET  
680 I Z4>1,C VOVA

### **Блок В LOMA**

1 V=1,W=1,I=Z 7-1  
2 I=I+6,MI=MI+W,W9\*X  
3 D Z3,2  
5 I=-Z3\*6-7+I,V=V\*X,W=V  
6 D Z3,2,6  
7 I=Z7,W=1  
8 I=I+6,MI=E\*W+MI,W=W\*X  
10 D Z3,8

### **Блок В SOLV**

1 Z1=Z7+5,N=Z1,P=0,L=Z3,I=4-L+Z7,K=L+2,Z8=L,G 9  
3 J=I-P,MI= MI\*X-MJ,I=I-1  
5 D K,3  
7 N=N+6,X=MZ1/MN,I=I+L+8,P=P+6,C 5  
9 D Z8,7  
10 I=10-L+Z7  
12 Z1=Z1+5,N=Z1,P=0,Z8=Z8-1,C 9  
14 I=16-L+Z 7  
16 C 12  
18 I=18+Z7,I L=3,G 22

20 C 12  
22 J=25+Z7,K=J,N=0  
24 M=0, I=30+Z7  
26 I MJ=0,G 30  
28 MI=MI-M/MJ  
30 K=K-6, J=K,N=N+1,C 24  
32 G 36  
34 M=MJ\*MI+M,J=J+1,I=I-6  
36 D N,34  
40 D 3,36,40

### **Блок В PROG**

10 R,/"LINE X?"L" Y?"W  
15 I=L-1\*2+31,L=L-1\*3+20 =L+2,I W=7,ZK=0,G 101  
25 W,"CURVE #?"  
30 L=L+1,R,ZL  
35 I ZL=0,G 101  
40 W,"CALIB 0/3/4?"  
42 C 30  
43 I ZL=0,G 50  
44 R,/"DPM I1="MI  
45 I ZK>20,I=I+1,R," I2="M1  
50 W,"RISTO?"  
55 C --  
60 W,/  
65 I W=7,G 99  
70 I W>7,I ZK=0,I ZK=0,I ZL>0,G 90  
75 I ZK=0,G 99  
80 I W=8,I ZK>20,I ZK<27,G 99  
82 I W=9,I ZK>23,I ZK<27,G 99  
85 I W<7, I ZK<10,G 99

87 C 92  
90 C 50  
92 N ZK,ZL,ZN  
94 W,"Y?"  
96 C 25  
98 W,"ERROR"  
99 W,"END"  
100 H  
101 ZN=0,L=N,G 50

### **Блок В TAPE**

10 R I,K  
15 I K>20,G 45  
20 J=K--\*--+50  
30 J=J  
35 D 6,30  
40 G 75  
45 I K>23,G 65  
50 J=K-21\*19+113  
55 D 19,30  
60 G 75  
65 J  
70 D 3,30  
75 W,"END"/  
76 H

### **Блок В SCET**

10 N=Z6/3  
20 I=O,K=179  
30 I=I+1  
35 A=K,M20=0

40  $K=K+1, M20=M20+MK$   
 50 D2,40  
 60  $M21=M20/3$   
 70  $K=$   
 80  $J+1, M22=M21-MK, I M22<0, M22=-M22$   
 90  $MJ=M22/M21*100$   
 100 D2,80,100  
 110 I  $M23>M24, G ---$   
 120 I  $M24-M25, G 160$   
 130 I  $M23>M25, G 150$   
 140  $M26=M25, G 170$   
 150  $M26=M23, G 170$   
 160  $M26=M24$   
 170 I  $M26<10, G 250$   
 180 I  $M26=M23, K=K-2$   
 190 I  $M26=M24, K=K-1$   
 210  $MK=0$   
 220  $K=A, M20=0$   
 230 C 40,60  
 240  $M21=M20/2$   
 250  $L=179+I, ML=M21$   
 260 I  $I<N, G 30$   
 270  $N=N-6/8$   
 275  $K=185, I=0$   
 280  $M20=M182+M185$   
 285  $M21=M20*M2:B-M22=M182*M182, M23=M185*M185, M24=H22+M23$   
 300  $K=K+1, I=I+1, M22=MK, M23=MK*MK$   
 302  $M28=M182*MK, K=K+1, M22=M22+MK$   
 310  $M26=M23+M25, M27=M22*M22$   
 315  $M30=M28+M29, M21=M21/3, M27=M27/3$   
 320  $M31=M24-M21/2, 31$

325  $M32=M26-M27/2, M32=SQR M32$   
 330  $M33=M20*M22/3, M34=M30-M33/2$   
 335  $M35=M34/M31/M32, M31=M31*M31$   
 340  $M36=M34/M31, M20=M20/3, M22=M22/3$   
 350  $M37=-M36*M20+M22$   
 360  $W, /2*I"GROUP"/3*@"NSB: Y="6*M37"+$   
 370  $W, 6*M36"X"5*@"R="6*M35$   
 375  $I M35<0.9, W, 5*@"ATTENTION !!!!!"$   
 380  $J=0, L=179$   
 385  $J=J+1, L=L+1$   
 390  $MJ=M36*ML+M37$   
 400  $D 5, 385, 400$   
 402  $W ,/5*@"SB"$   
 405  $J=0$   
 410  $K=K+1, J=J+1, MK=MK-MJ, W, 3* @6*MK$   
 420  $D 5, 410, 420$   
 424  $K=K-6, L=179, J=0, W, /3*@"SB/F"$   
 427  $K=K+1, L=L+1, J=J+1$   
 430  $MJ=ML-MK, MJ=MK/MJ, W, 3* @6*MJ$   
 440  $D 5, 427, 440$   
 450  $M20=0, K=K-6, J=0, M22=0, M23=0, M25=0, M27=0$   
 460  $K=K+1, J=J+1$   
 470  $M20=M20+MK, M21=MK*MK, M22=M22+M21, M23=M23+MJ$   
 471  $M24=MJ*MJ, M25=M25+M24, M26$   
 480  $D 5, 460, 480$   
 482  $B=6$   
 485  $M30=M20*M23/B, M31=M20/B, M32=M32/B$   
 490  $M39=M20*M20/B, M40=M23*M23/B$   
 500  $D=B-1, M28=M22-M39/-, M28=SQR M28$   
 505  $M29=M25-M40/D, M29=SQR M29$   
 510  $M33=M27-M30/D$

520  $M34=M33/M28/M29, M28=M28*M28$   
 525  $M35=M33/M28, M36=-M35*M31+M32$   
 530  $M37=-M36/M35, M38=-1/M35$   
 540  $W, / @ @ @ " Y = " 6 * M36, 9 * M35 " X "$   
 545  $W, / @ @ @ " B MAX = " 6 * M37 @ @ @ " KD = " 6 * M38 @ @ @ " R = " 6 * M34$   
 550  $K=K-6, J=0$   
 560  $K=K+1, J=J+1$   
 570  $M20=M20-MK, M23=M23-MJ, M41=MK*MK, M42=MJ*MJ$   
 571  $M43=MK*MJ$   
 580  $M22=M22-M41, M25=M25-M42, B=5, M27=M27-M43$   
 590 C 485,540  
 600  $W, / @ @ @ 2 * J$   
 610 C 545  
 615  
 $M20=M20+MK, MK23=M23+MJ, M27=M27+M43, M22=M22+M41, M25=M25$   
 $+M42$   
 620 I  $J < 6, G$   
 630 I  $I < N, G 280$

### **Блок В INPUT**

5  $I=0, K=0$   
 10  $I=I+1, K=K+1, L=179+1$   
 15  $W, 3*1$   
 17  $R, " = " ML$   
 20 I  $K=5, K=0, W, /$   
 25  $Z6=I$   
 30 G 10

### **Блок В HIST**

10  $W, // 15 * @ " DR KEVORKIJAN HISTOGRAM "$   
 15  $W, //$

20  $K=0, W, /4 * @ " 0 " @ @$   
 30  $K=K+5, W, 3 * K @ @$   
 35 D 9,30  
 40 W, "%"  
 45  $W, /4 * @ " I " 10 * " ---- I "$   
 46  $K=1 79, N=0, M3=0$   
 47  $K=K+1, N=N+1, M3=M3+MK$   
 48  $I N < Z6, G 47$   
 50  $K=179, N=0$   
 53  $K=K+1, N=N+1, I=MK/M3 * 100 - 1, W, /3 * N @ " I "$   
 55  $I Z2 > 20, G 80$   
 60  $I I > 0, W, I * @ " * "$   
 65  $I I = 0, W, " * "$   
 70 G 250  
 80  $K=K+1, J=MK/M4 * 50 - 1$   
 82  $I I < 0, I = - 1$   
 83  $I J < 0, J = - 1$   
 85  $I I > J, G 210$   
 90  $I I < J, G 110$   
 100 G 60  
 110  $L=J-1, I I > 0, W, I * @ " X "$   
 120  $I I = 0, W, " X "$   
 130  $I L = 0, W, " + "$   
 140  $I L > 0, W, L * @ " + "$   
 150 G 250  
 210  $L=I-J-1, I J > 0, W, J * @ " + "$   
 220  $I J = 0, W, " + "$   
 230  $I L = 0, W, " X "$   
 240  $I L > 0, W, L * @ " X "$   
 250  $I N < Z6, G 53$   
 260 C 45

270 C 20,45

275 W,/5\*@"GLAD TO HELP YOU AGAIN !!!!!"

280 W,///

### **Блок В НАУК**

1 I Z4=2,D=5

2 I Z4=3,D=3

3 I Z4=4,D=4

4 I Z4=5,D=2

5 K=1 79,N=0,J=0,Z6=Z6/D

7 M20=0

10 K=K+1,N=N+1,M20=M20+MK

15 I N<D,G 10

20 J=J+1,M22=0

25 M26=M20/D,K=K-D,E=D-1,F=D\*E

26 Z10=E

30 K=K+1,M23=MK-

35 D Z10,30,35

40 M22-M22/F,M27=SQRM22,N=0

50 W,/2\*@"2\*J"MEAN="7\*M26,5\*@"STD ERR="7\*M27

52 I Z4=2,G 57

53 I Z4=4,G 57

56 C 65

57 I J<2,M31=M26

58 I J<2,M1-M27

59 I J<2,--

60 M24=M26-M31,A=M1\*M1,B=M27\*M27,C=A+B/2,M25=SQRC

62 W,/2\*@"2\*J"-1 MEAN="7\*M24,5\*@"STD ERR="7\*M25

65 I J<Z6,G 7

70 W,/5\*@"THE END"

### **3.3. Спектр аффинности кальция с мембранными белками саркоплазматического ретикулула.**

#### **3.3.1. Экспериментальная модель острого панкреатита**

Экспериментальная модель острого панкреатита (ОП), сопровождающегося выбросом из ишемизированной поджелудочной железы октапептид, вызывающего некротическое поражение миокарда и обозначенного как «миокард депрессирующий фактор» (МДФ), оставляет значительные сдвиги в аффинности мембранных белков СР и М к ионам кальция.

Наиболее хорошо изученными белками СР являются  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза, с о.м.м. 120 кДа, который при ДДС-содержащем эл. фореze разделяется на две субъединицы, кальсеквестрин (55 кДа), фосфоламбан (22 кДа). 5 кислых мембранных белков изучены относительно мало, а белок с о.м.м. 32 кДа не изучен вовсе.

Так, все 5 кислых белков мембран СР не претерпевают достоверных изменений в степени сродства к  $\text{Ca}^{2+}$  в геморрагической стадии развития ОП (Guevorgyan A.G., 2014).

В экспериментальной части диссертационной работы разработанная программа подсчета специфического и неспецифического связывания радиолиганда мембранными белками СР и М, была протестирована на определенной части уже имеющихся исследований, которые были проведены сотрудником отдела «патологической биохимии» Института биохимии НАН РА им. Г. Бунятына, стар. науч. сотр. Геворкяном А.Г. Пересчет имеющихся результатов показали, что между результатами компьютерной и ручной обработкой результатов, отклонения составляют в пределах статистической ошибки - 3-5%, а скорость обработки полученных результатов отличаются в 15-20 раз в пользу компьютерной обработки.

Следовательно, несмотря на факт идентичности результатов между двумя методами обработки полученных на сцинтилляционном спектрометре результатов по величине коэффициента корреляции (в обоих случаях корреляция составляла 90%), была необходима разработка программы, изложенная в настоящей работе.

Итак, приведенные на рис. За радиогистограммы величины сродства  $^{45}\text{Ca}^{++}$  к мембранным белкам СР показывают, что у интактных животных к ионам кальция

имеют сродство 5 кислых белков (рис. 3, пики 1, 3, 4, 5, 6), кальсеквестрин (пик 2) и два пика кальциевой АТФазы (пики 6 и 7). Величина каждого пика соответствует величине радиоактивности включенного в структуру белка  $^{45}\text{Ca}^{++}$ , с активностью 100 импульсов/мин на каждые 5 мм высоты пика. На рис. 3b представлена радиограмма спектра сродства мембранных белков СР в некротической стадии (24 часа) развития панкреатита, когда весь спектр кальций-связывающих белков СР в той или иной степени снижает сродство к ионам кальция. Мембранный белок с о.м.м. 32 кДа, который в норме не связывает кальций, наоборот, приобретает сродство к ионам кальция. Эти данные взяты с работы Геворкяна А.Г. (1998: 2014) как уже изученные и рассчитанные по Скетчарду, однако без применения разработанной в данной диссертационной работе программы обработки и расчета результатов. Сопоставляя результаты ручной и машинной обработки, было сделано предварительное заключение о целесообразности и статистической достоверности составленный программы.

Изучения были продолжены на 7-ой, 14-ый и 21-ый дни развития острого панкреатита. В эти же сроки было изучено корригирующее влияние природного гипоталамического цитокина – «пролином богатого цитокина», ПРП (рис. 3 с, d и e), т.е. соответственно, репаративная, хроническая и хроническая рецидивирующая стадии развития панкреатита.

Анализ полученных результатов показал, что через 24 часа инициирования ОП мембранные белки СР частично или полностью теряют способность связывать кальций, за исключением  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы, которая сохраняет сродство к ионам кальция, тем самым сохраняя сократительную способность миокарда. Введение на фоне нарушения аффинности мембранных белков к ионам кальция ПРП, проявляет положительное воздействие и восстанавливает сродство белков к ионам кальция, защищая миокард от неминуемой остановки в результате развития «текучести» мембран, резкого снижения концентрации кальция в СР и гибели кардиомиоцитов.

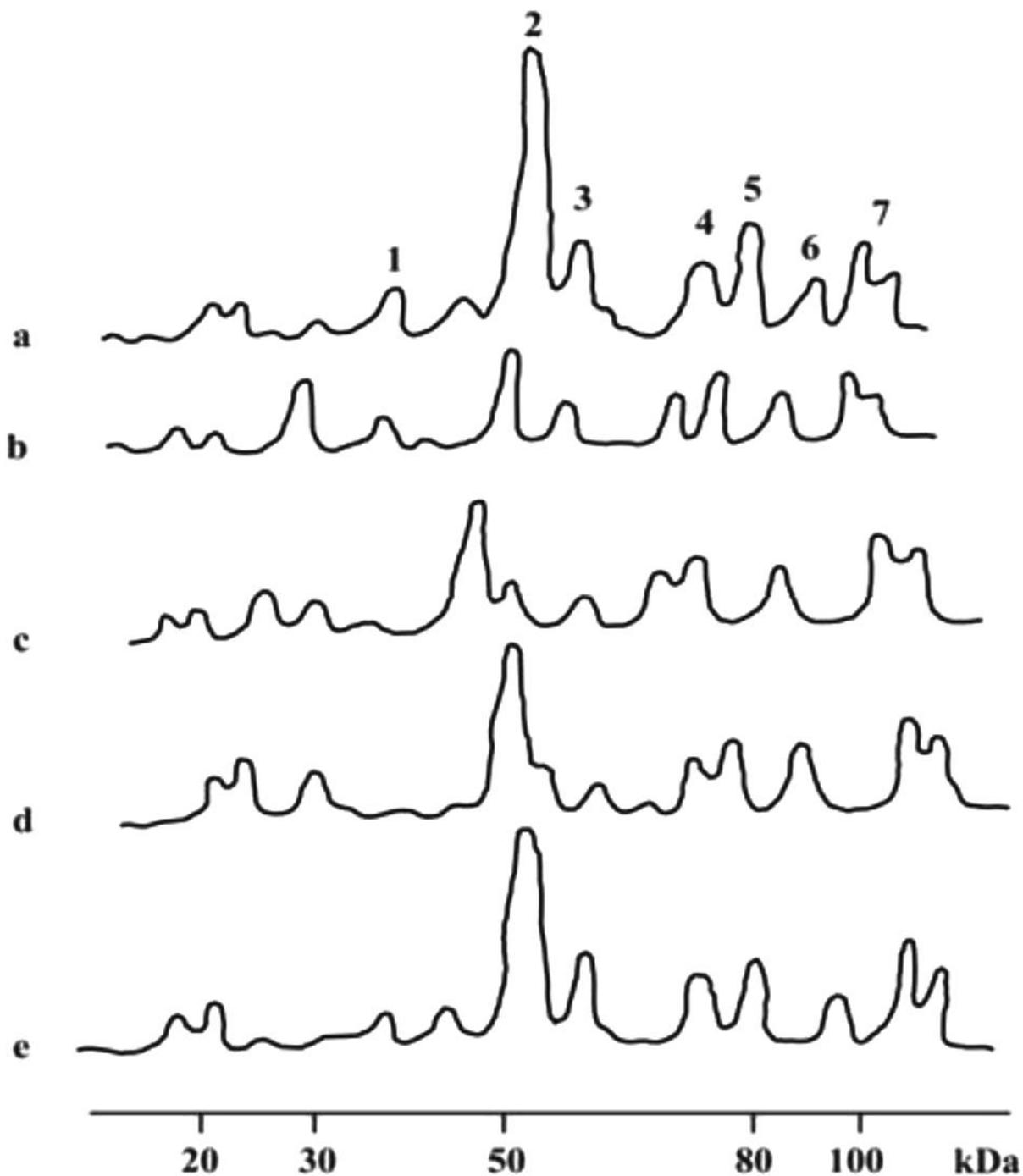
Разработка и применение компьютерной программы позволили с высокой достоверностью подтвердить имеющиеся уже данные о компенсаторном механизме защиты миокарда от колебаний концентрации кальция и, опосредованное этим, развитие инфаркта миокарда. Поскольку разработанная программа позволяла

быстрому определению аффинности ионов кальция к мембранным белкам, в процессе развития патологии ОП, мы получили достоверные данные по усилению аффинности по мере развития патологии.

Так, было сделано предположение, а в последствии и доказано, что потеря аффинности к ионам кальция столь важного мембранного белка, каким является кальсеквестрин, частично компенсируется белком с о.м.м. 32кДа, который у интактных крыс не проявлял сродства к ионам кальция. Происходит изменение изоэлектрической точки данного белка (Геворкян А.Г., 1997). Так, у интактных белых крыс этот белок имеет щелочной рН (8,3), а по мере развития патологии ОП переходит в кислый – рН 5,9-6,3. Однако, как показали наши дальнейшие исследования, этот факт становится основным доказательством аффинности значительного количества ионов кальция. В состав белковой молекулы встраиваются моноамино дикарбоновые аминокислоты, которые и изменяют изоэлектрическую точку данного белка, и, тем самым, связывают 2-х валентный кальций второй карбоксильной группой аспарагиновой и глутаминовой кислот. Определение параметров аффинности –  $V_{max}$ ,  $K_d$ , при высоком значении коэффициента корреляции ( $R$  92%) доказывает специфическое связывание ионов кальция. Предположение о синтезе нового белка с о.м.м. 32 кДа De novo не представляется возможным, происходит лишь незначительное изменение аминокислотного состава с включением в состав двух аминокислот кислой природы.

Что касается регулирующего воздействия ПБП, который на 90% восстанавливает интактный спектр мембранных белков СР, можно с высокой достоверностью заключить об изменении аминокислотного состава белка с о.м.м 32 кДа и восстанавливающего структуру белка при воздействии природного гипоталамического цитокина – ПБП.

Необходимо подчеркнуть, что природный цитокин ПБП оставляет свое регуляторное воздействие на аффинность мембранных белков к ионам кальция путем коррекции изменений по ходу развития патологии ОП и СДР, однако заметно не влияет на количественный состав белкового спектра тех же мембран. Зарегистрированы лишь незначительные, статистически недостоверные изменения.



**Рис. 3.** Гистограмма аффинности ионов кальция к мембранным белкам CP при экспериментальном ОП и под влиянием ПБП.

а.- интактные крысы, б.-ранняя стадия (7дней ОП), с. – репаративная стадия (7 дней ОП) и влияние ПБП, d.- хроническая стадия (14 дней ОП и влияние ПБП) е. – хроническая стадия (21 день ОП и влияние ПБП).

5мм пика гистограммы соответствует 100 импульсов/мин.

**Таблица 1.**

**Определение сродства ионов кальция к мембранному белку 32 кДа саркоплазматического ретикулума при остром панкреатите и под влиянием «пролином богатого пептида».**

Сродство кальция	<i>V</i> <sub>max</sub> , нмоль кальция × мг <sup>-1</sup> белка		<i>K</i> <sub>d</sub> , нМ кальция × мг <sup>-1</sup> белка	
	Центр с низким сродством	Центр с высоким сродством	Центр с низким сродством	Центр с высоким сродством
Ранняя стадия ОП- 24 часа	47.63 ± 1.1	245.43 ± 9.92	4.58 ± 0.37	13.28 ± 0.31
Репаративная стадия ОП – 7 дней	48.17 ± 0.72	245.16 ± 8.06	1.81 ± 0.15	9.07 ± 0.49
Хроническая стадия ОП – 14 дней	37.15 ± 0.91	221.54 ± 8.87	1.54 ± 0.22	7.51 ± 0.35
Хроническая рецидивная стадия ОП – 21 день	44.35 ± 0.76	226.68 ± 7.71	1.79 ± 0.3	8.02 ± 0.31
Воздействие ПБП – 24 часа ОП	6.73 ± 0.5	36.5 ± 2.98	0.3 ± 0.02	2.43 ± 0.02
Воздействие ПБП – 7 дней ОП	6.25 ± 0.21	34.44 ± 2.24	0.12 ± 0.01	1.24 ± 0.05
Воздействие ПБП – 14 дней ОП	2.23 ± 0.29	22.35 ± 2.98	0.62 ± 0.02	1.01 ± 0.02
Воздействие ПБП – 21 день ОП	5.65 ± 0.74	29.96 ± 2.02	0.73 ± 0.04	1.32 ± 0.03

Коэффициент корреляции - R=90%

Достоверность -  $\sigma_t = 92\%$

Анализ полученных результатов показал, что как и во всех определениях Скетчарда, максимальное количество связавшегося лиганда –  $V_{max}$ , имеет две точки связывания  $^{45}Ca^{++}$  – с низким и высоким сродством. Таким образом, мембранный белок с о.м.м. 32 кДа, который у интактных крыс не проявляет сродства к ионам кальция, при ОП приобретает это свойство, и во все изученные сроки развития ОП – 24 часа - 21 день это способность сохраняется, и остается примерно на одинаковом уровне, как в центре с высоким, так и в центре с низким сродством. Гораздо значительно изменяется константа диссоциации белок-лигандного комплекса как в центре с высокой, так и в центре с низкой аффинностью. Величина  $K_d$  призвана показывать то количество связавшегося лиганда, который, в независимости от конформационного изменения структуры и свойства белка, остается всегда связанным с молекулой белка. Кроме того, в СР имеется специальный белок кальсеквестрин, который, благодаря высокому содержанию кислых аминокислот, способен прочно связывать ионы  $Ca^{2+}$ . Сродство кальсеквестрина, обладающего наиболее выраженным сродством к ионам кальция, способен связывать до 43 молей  $Ca^{2+}$  на моль белка. Имеет две изоформы - CASQ1- в скелетных мышцах и CASQ2 – в сердечной мышце. Кальсеквестрин работает по следующей схеме - деполяризация плазматической мембраны передается через Т-трубочки на потенциал-управляемый мембранный белок (так называемый "SR-foot") прилегающей мембраны СР, который открывает  $Ca^{2+}$  - каналы. Результатом является выброс ионов  $Ca^{2+}$  из СР в пространство между филаментами актина и миозина до уровня  $\geq 10^{-5}$  М. В конечном итоге выброс ионов  $Ca^{2+}$  является пусковым механизмом процесса сокращения миофибрилл. А также, благодаря регулируемому структуре и функцию белка кальсеквестрина – природного цитокина ПБП, исключается опустошение везикул СР от кальция и предотвращения явления «текучести мембран» и сохранения функций СР, так необходимого для нормального функционирования миокарда и обеспечения энергией и нормальным метаболизмом.

Исходя из вышеизложенного, можно предположить те отрицательные сдвиги в миокарде, которые несопоставимы с его нормальным функционированием. Отсюда

следует важность функции, которую берет на себя белок с о.м.м. 32 кДа, когда кальсеквестрин почти полностью теряет способность к удержанию ионов кальция.

Второй, немаловажный белок, проявляющий сродство к ионам кальция, является Са-АТФаза (рис. 3 -7), регулирующий поток  $\text{Ca}^{2+}$  к миофибриллам и обратно в цистерны СР. Однако как при ОП, так и при СДР, этот белок претерпевает незначительные изменения как в количественном, так и качественном аспектах, удерживая почти интактный уровень кальция. Основной функцией Са-АТФазы является поддержание низкой концентрации кальция в цитоплазме большинства типов клеток, который способен переносить через мембрану 2 иона  $\text{Ca}^{2+}$  против градиента его концентрации за счет гидролиза 1 молекулы АТФ.

Проведенные нами исследования показали высокую толерантность Са-АТФазы к повреждению миокарда при ОП и СДР. Этот белок настолько противодействует патологиям, что, как видно из гистограмм (рис. 3, рис. 4), он остается неизменным и качественно и количественно.

Как видно из результатов гистограммы (рис. 3 с, d, e), введение биологически активного цитокина ПБП, восстанавливает спектр сродства мембранных белков к ионам кальция. Происходит восстановление картины сродства, примерно равной картине у интактных крыс. Данные, приведенные в табл. 1, показывают резкое снижение аффинности ионов кальция с мембранным белком с о.м.м. 32 кДа. Таким образом, белок с о.м.м. 32 кДа, который, согласно полученным данным, при патологии ОП компенсирует снижение этого свойства у кальсеквестрина, при восстановлении его спектра, возвращается к исходному уровню.

Количественное исследование белкового спектра мембран СР показало, что статистически достоверного изменения как при ОП, так и в дальнейшем СДР, не происходит (табл. 2).

**Таблица 2.****Количественное содержание отдельных белков в тотальной фракции  
мембран саркоплазматического ретикулула**

<b>О.м.м., кДа</b>	<b>Интактные</b>	<b>Некроз при ОП</b>	<b>Некроз при СДР</b>	<b>Некроз при ОП+ПБП</b>	<b>Некроз при СДР+ПБП</b>
<b>100</b>	50,2±4,2	44,8±3,4	47,3±4,2	49,2±3,9	48,3±5,4
<b>80</b>	62,9±3,5	59,7±2,9	54,5±3,1	60,1±5,1	56,8±4,7
<b>65</b>	88,6±5,4	89,5±6,8	85,1±4,9	74,9±6,7	86,5±5,5
<b>55</b>	50,2±4,1	62,6±4,9	52,3±3,8	54,3±3,9	52,6±2,9
<b>32</b>	34,6±2,7	31,2±2,2	33,4±2,6	32,7±2,8	32,1±1,9
<b>20</b>	25,8±2,3	29,4±2,3	26,8±1,9	29,6±2,7	26,5±2,2

Данные выражены в мкг·мг белка<sup>-1</sup> тотальной фракции. В лунку 10% ПААГ нанесено 150 мкг белка. М±m, n=6

### **3.3.2. Экспериментальная модель «синдрома длительного раздавливания»**

«Синдром длительного раздавливания» (СДР) или Краш-синдром считается тяжелой полифункциональной патологией, затрагивающей все орган-системы организма и развивающейся после длительного раздавливания мягких тканей при техногенных авариях, землетрясениях и других катастрофах.

При длительном раздавливании мягких тканей начинается развиваться рабдомиолиз — синдром, представляющий собой крайнюю степень миопатии и

характеризующийся разрушением клеток мышечной ткани, резким повышением уровня креатинкиназы и миоглобина, миоглобинурией, развитием острой почечной недостаточности. Травма или инфекция, а также иные причины могут вызвать рабдомиолиз в любом возрасте. Заболеваемость зависит также и от этиологии острого некроза скелетных мышц. В более молодом возрасте к острому некрозу скелетных мышц ведут наследственные нарушения. Заболевание является результатом местных повреждений (например, травма мышц, отёк мышц, компрессия), а также системных эффектов многих биохимических токсинов и биоактивных веществ, а также — гипоксии.

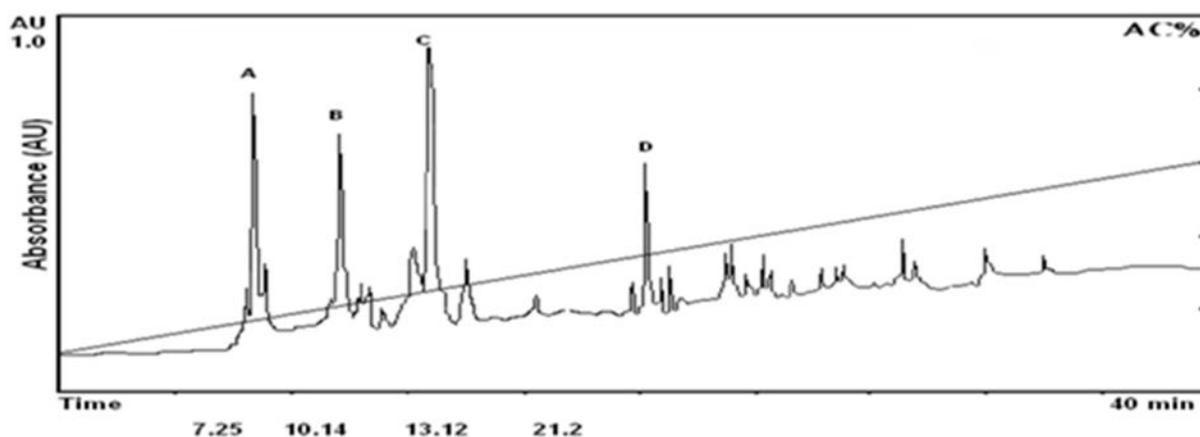
Клиническая картина зависит от степени тяжести рабдомиолиза. При лёгких формах патология со стороны мышц может быть не выявлена, при этом диагностируют состояние по изменениям в крови. В более тяжёлых случаях возникают боль в мышцах, слабость и отёчность мышц (Bosch X. et al., 2009). Если отёчность нарастает быстро (например, при синдроме длительного раздавливания), восстановленный после сжатия кровоток – реперфузия, в поражённую мышцу может привести к низкому кровяному давлению и шоку. Попадание продуктов распада мышц в кровоток приводит к нарушениям электролитного состава, что вызывает тошноту, рвоту, растерянность, кому или нарушение ритма сердца. Моча может быть тёмной (чайного цвета), что обусловлено наличием миоглобина в ней. При повреждении почек уменьшается или отсутствует образование мочи, как правило, через 12-24 часа после повреждения мышц (Sauret J.M. et al., 2002; Huerta-Alardín A.L., Varon J, Marik P.E, 2005).

Симптомы и признаки почечной недостаточности аналогичны таковым при острых почечных патологиях другой этиологии.

Важно дифференцировать причины окрашивания мочи в красный цвет: Возможные причины окрашивания мочи: 1) миоглобинурия: рабдомиолиз; 2) гемоглобинурия: гемолиз (механическое повреждение, иммунологическое повреждение, структурная хрупкость эритроцитов, микроангиопатия); 3) гематурия: почечная патология, постренальная патология; 4) экзогенные факторы: употребление в пищу красной свеклы, лекарственные препараты (витамин B12, рифампицин, фенолфталеин, фенитоин), метаболиты (билирубин, порфирин).

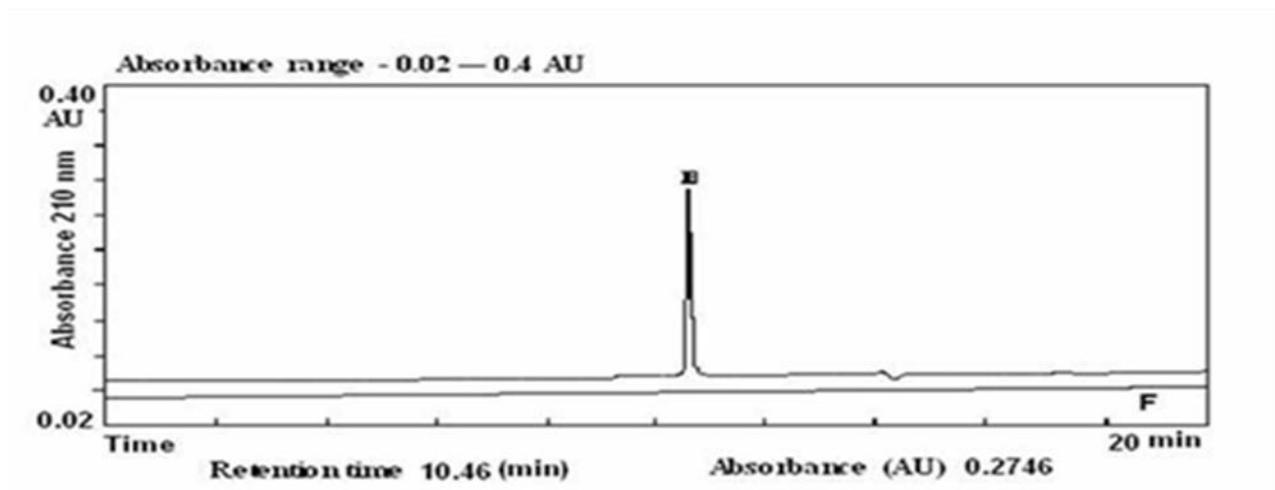
Изучение СДР начались в отделе «патологической биохимии» задолго до Спитакского землетрясения в 1988 году. Только исследованиями, проводимыми в данной работе, удалось полностью описать развитие повреждения миокарда, а также картину развития инфаркта миокарда.

После длительной компрессии происходит протеолиз мышечного белка – миоглобина, состоящего из 154 аминокислотных остатка. Миоглобин имеет третичную гем-содержащую белковую структуру (рис. 6). Образовавшиеся фрагменты в анаэробных условиях, в условиях застоя крови и под воздействием развивающихся в образовавшихся ранах микрофлоры, становятся токсичными. После декомпрессии, когда восстанавливается ток крови, реперфузия, эти токсины распространяются по всему организму. Как уже было изложено в главе «литературный обзор», были идентифицированы 4 пептида, состоящие из 4, 5, 7 и 9 аминокислотных остатков и определен аминокислотный состав а также проведена HPLC хроматография по определению этих пептидов (Guevorkian A.G. et al., 2011). Морфологическое изучение структуры поврежденного миокарда показало характерную картину инфаркта миокарда, диффузно распространенного по всей поверхности (рис. 4).



**Рис. 4.** Разделение нонапептида проводили в условиях градиента на колонке Agilent C18 (250x3,0 mm). Элюация проводилась средой ацетонитрил/вода 0,1% ТФА в условиях линейного градиента со скоростью 1мл/1 мин. Продолжительность

составляла 40 мин, измерение при 210 нм. Данные указывают на гомогенность без содержания низкомолекулярных соединений.



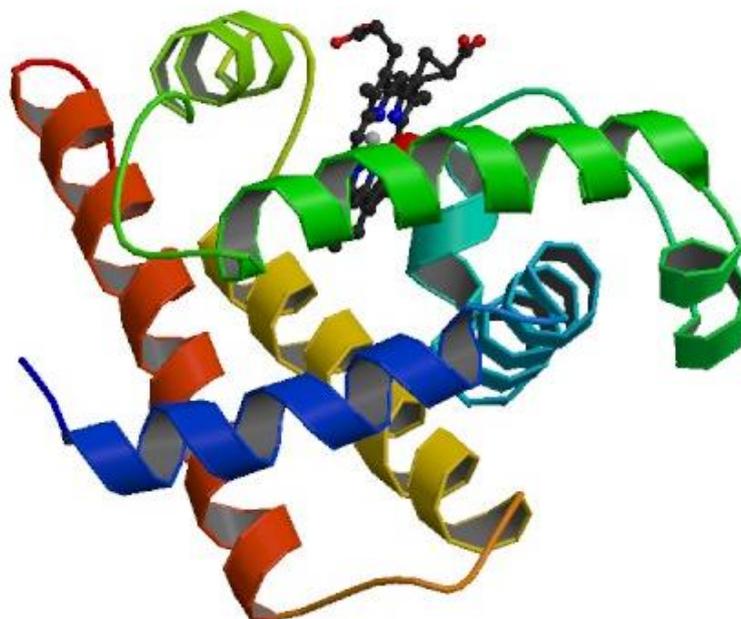
**Рис. 5.** Рехроматография нонапептида на колонке Biosphere Si-100 C18 (250x4,6 мм).

Сдвиги в аффинности белковых молекул к ионам кальция повторяют аффинность мембранных белков СР при патологии ОП. Как и при ОП, основные кальций-связывающие белки теряют сродство к кальцию. Особенно заметна эта потеря у кальсеквестрина (о.м.м. 55 кДа). Все пять молекул кислых белков также подвергаются этим изменениям (пики 1, 3, 4, 5, 6). Лишь молекула  $\text{Ca}^{2+}$  - АТФазы претерпевает незначительные изменения.

Вновь на передний план выдвигается белок с о.м.м. 32 кДа, который, при ОП, не проявляет аффинность к ионам кальция у интактных крыс, однако, с развитием патогенеза при СДР, усиливает это свойство. При ОП возникает естественное мнение о компенсаторном включении защитных механизмов, предохраняющих СР миокарда от опустошения кальция, т.е. предотвращает «текучесть мембран» и отток ионов кальция из везикул СР.

Было показано, что количество специфически связанного кальция с белком с о.м.м 32 кДа составляет 42,52 пмоль/мг белка центра с низким сродством и 342,5 пмоль/мг белка для центра с высоким сродством. Кальсеквестрин у интактных крыс

связывает кальций до 43 пмоль на моль белка центром с низкой аффинностью и 287,35 пмоль/мг белка центром с высоким сродством.



**Рис. 6.** Структура миоглобина (<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1MBN>)

**1-60** Met.Gly.Leu.Ser.Asp.Gly.Glu.Trp.Gln.Leu.Val.Leu.Asn.Val.Trp.Gly.Lys.

Val.Glu.Ala.Asp.Ile.Pro.**Gly.His.Gly.Gln.Glu.Val.Leu.Ile.Arg.**Leu.Phe.Lys.

Gly.His.Pro.Glu.Thr.Leu.Glu.Lys.Phe.Asp.**Lys.Phe.Lys.His.Leu.**Lys.Ser.Glu.Asp.Glu.Met.  
Lys.Ala.Ser.Glu.

**61-120** Asp.Leu.Lys.Lis.His.Gly.Ala.Thr.Val.Leu.Thr.Ala.Leu.Gly.Gly.Ile.Leu.Lys.

**Lys.Lys.Gly.His.His.Glu.Ala.**Glu.Ile.Lys.Pro.Leu.Ala.Gln.Ser.His.Ala.Thr.

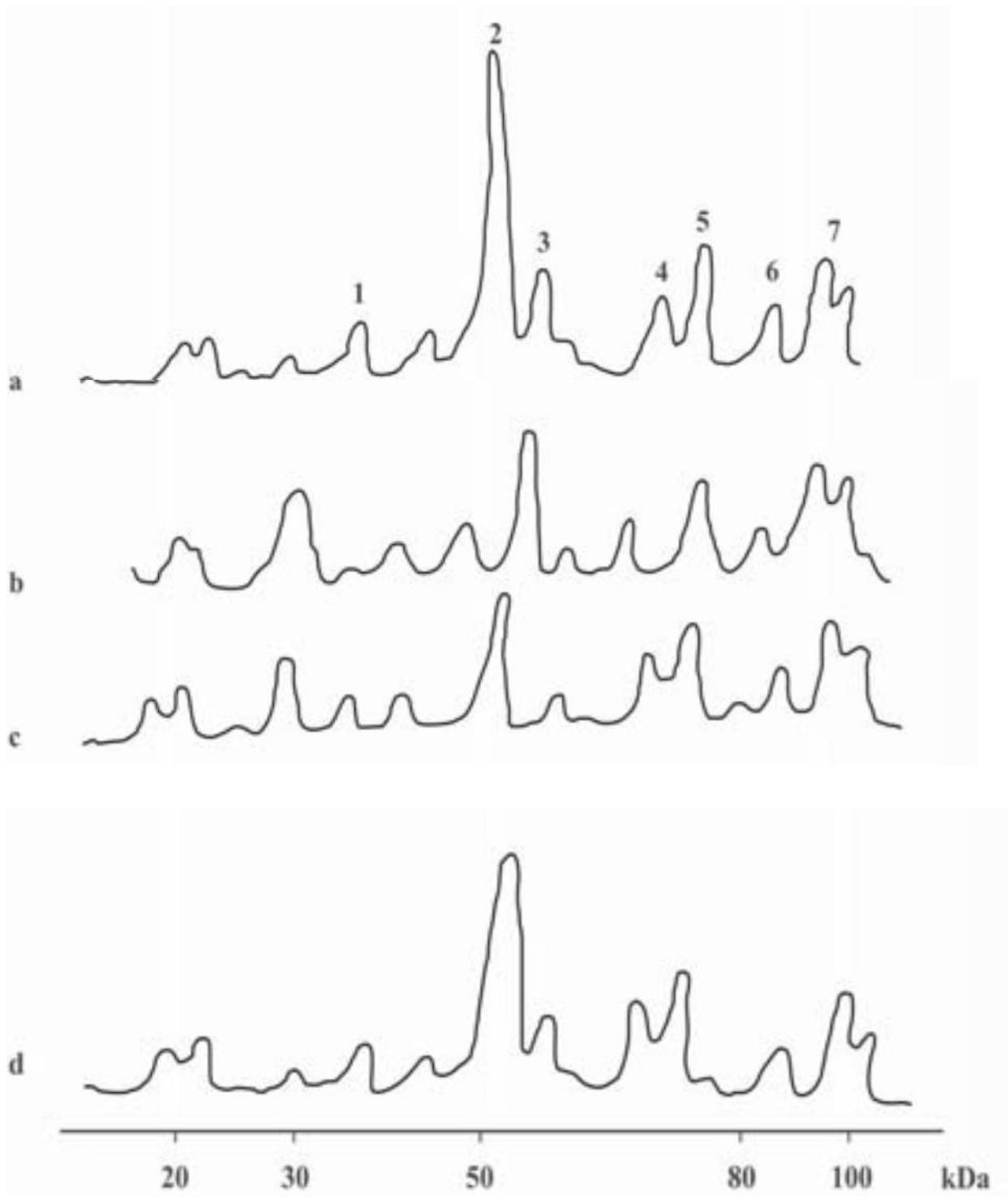
Lys.His.Lys.Ile.Pro.Val.Lys.Tyr.Leu.Glu.Phe.Ile.Ser.Glu.Cys.Ile.Ile.Gln.

Val.Leu.Gln.Ser.Lys.His.

**121-154** Pro.Gli.Asp.Phe.Gly.Ala.Asp.Ala.Gln.Gly.Ala.Met.Asn.Lys.Ala.Leu.Glu.

Leu.Phe.**Arg.Lys.Asp.Met.Ala.**Ser.Asn.Tyr.Lys.Glu.Leu.Gly.Phe.Gln.Gly.

Красным цветом отмечены токсичные пептиды в результате протеолиза миоглобина при СДР.



**Рис. 7.** Радиогистограмма мембранных белков СР при патологии СДР.

а. - интактные животные, b – 2 ч декомпрессии после 2 ч компрессии, с - 4 ч декомпрессии и под воздействием ПБП, d – 48 ч декомпрессии и под воздействием ПБП.

5мм пика гистограммы соответствует 100 расп/мин.

Таким образом, можно предположить, что белок с о.м.м. 32 кДа практически полностью компенсирует утраченное свойство кальсеквестрина при патологии, тем самым предохраняя миокард заложенным в нем компенсаторным механизмом, не допуская гибели миокарда. Причем, идентичная картина прослеживается как при ОП, так и при СДР.

Как показывают результаты, представленные на радиофореграмме (рис.7) и табл. 3, введение «пролином богатого пептида» на фоне «синдрома длительного раздавливания» корректирует структуры мембранных белковых молекул, что выражается в корректировке аффинности этих белков к ионам кальция. Так восстанавливается аффинность кальсеквестрина, которая была утрачена при патогенезе СДР.

### **3.4. Белковый спектр мембран саркоплазматического ретикулула**

Исследование белкового спектра мембран СР на предмет сродства к ионам кальция выявило, что в посткомпрессионном периоде после 2 ч компрессии Са-связывающие 5 кислых белка и кальсеквестрин (55кДа) значительно снижают степень сродства к ионам кальция (Guevorgyan A. et al., 2016).

Идентичная картина снижения спектра связывания ионов Са мембранными белками СР прослеживается как при остром панкреатите (ОП), так и при «синдроме длительного раздавливания» (СДР). Потеря сродства ионов кальция, связанных с мембранными белками СР и снижение его концентрации в СР, может вызвать отрицательный эффект для этих органелл (табл. 2). Уменьшение концентрации ионов кальция ниже  $<300$  нМ вызывает процесс «текучести» мембран, когда содержание кальция снижается, и СР перестают выполнять возложенные на эти органеллы функции.

**Таблица 3.**

Определение сродства ионов кальция к мембранному белку с о.м.м. 32 кДа саркоплазматического ретикулула «при синдроме длительного раздавливания» и под влиянием «пролином богатого пептида».

Сродство кальция	Втах, нмоль кальция x мг <sup>-1</sup> белка		Kd, нМ кальция x мг <sup>-1</sup> белка	
	Центр с низким сродством	Центр с высоким сродством	Центр с низким сродством	Центр с высоким сродством
СДР – через 2ч компрессии	45.62 ± 0.86	231.58 ± 9.51	1.92 ± 0.28	8.71 ± 0.26
2 ч декомпрессии	36.27 ± 0.53	237.42 ± 8.17	3.15 ± 0.38	11.13 ± 0.28
4 ч декомпрессии	48.81 ± 0.92	243.49 ± 10.01	4.71 ± 0.42	12.82 ± 0.29
24 ч декомпрессии	42.39 ± 0.67	232.68 ± 7.83	4.68 ± 0.39	14.73 ± 0.31
48 ч декомпрессии	44.12 ± 0.71	258.91 ± 8.82	5.63 ± 1.01	17.18 ± 0.38
ПРП после компрессии	4.19 ± 0.08	61.7 ± 1.34	1.78 ± 0.26	3.65 ± 0.13
ПРП после 2 ч декомпрессии	2.53 ± 0.06	54.22 ± 0.49	0.92 ± 0.19	2.45 ± 0.38
ПРП после 4 ч декомпрессии	2.39 ± 0.09	48.43 ± 0.37	0.85 ± 0.22	2.03 ± 0.27
ПРП после 24 ч декомпрессии	1.98 ± 0.07	31.28 ± 0.45	0.77 ± 0.19	1.98 ± 0.21
ПРП после 48 ч декомпрессии	1.55 ± 0.08	29.25 ± 0.33	0.65 ± 0.21	1.87 ± 0.23

Коэффициент корреляции - R = 90%

Достоверность -  $\sigma_t$  = 92%

Однако, система самосохранения СР для поддержания целостности и функции органелл включает адаптационный механизм, который переводит утраченные свойства кальсеквестрина (о.м.м. 55 кДа) на мембранный белок СР с о.м.м. 32 кДа, не проявляющий сродства к ионам  $\text{Ca}^{2+}$  у интактных крыс. Причем, с ростом отрицательного влияния СРД на миокард при увеличении периода декомпрессии, усиливается сродство данного белка к ионам кальция. Абсолютно одинаковые сдвиги в аффинности мембранных белков СР к ионам кальция наблюдается как при СДР, так и при ОП. Полученные результаты находятся в пределах статистической достоверности.

Для идентификации подобных сдвигов были изучены количественные сдвиги кальсеквестрина и белка с о.м.м. 32 кДа мембраны СР. Оказалось, что количество этих двух белковых фракций по ходу развития патогенеза при СДР и ОП отличаются статистически недостоверно - в пределах 10-12%. Проведение изофокусировки пептида с о.м.м. 32 кДа в среде с амфолинами показало, что нативный пептид имеет щелочную природу с рН 8,0-8,2. По мере развития патогенеза СДР в пост компрессионном периоде пептид, начинает приобретать кислый характер, а через 72 часа декомпрессии его кислотность составляет рН 6,8-6,9. Изучение аминокислотного состава пептида показало, что на 14-16% возрастает количество моноаминодикарбоновых кислот – глутаминовой и аспарагиновой кислот. Выстраиваясь в структуру пептида одной карбоксильной группой, вторую оставляют для связывания 2-х валентного кальция. Исследования этого пептида в отдаленном периоде декомпрессии (до 21 дня) показали, что аминокислотный состав, и, следовательно, и сродство к ионам кальция, постепенно приближается к интактной картине. Несомненно, что с самого начала в миокарде заложен мощный адаптационный механизм, позволяющий сердцу выдержать столь глубокие нарушения свойств мембранных белков СР как при ОП, так и при СДР.

Независимо от сроков развития патогенеза ОП или посткомпрессионного периода после СДР, количество мембранных белков СР, приведенные в таблице 2 меняется незначительно, в пределах 7-9%.

Сопоставляя результаты количественного спектра белковых фракций с аффинностью тех же белков по отношению к ионам кальция, можно заключить об

изменении аминокислотного состава фракции белков, что и позволяет приобретение новых свойств для усиления сродства ионов кальция с мембранными белками. Об этом факте свидетельствуют результаты изоэлектрической фокусировки в градиенте амфолинов, указывающие на приобретение кислотных свойств по мере развития патогенеза как при ОП, так и при СДР. Следует еще раз подчеркнуть идентичность, по аминокислотному составу, октапептида при ОП и декапептида при СДР с отличием 9-ой аминокислоты - аргинина при СДР.

### **3.5. Сродство ионов кальция к мембранным белкам митохондрий миокарда при остром панкреатите и при «синдроме длительного раздавливания»**

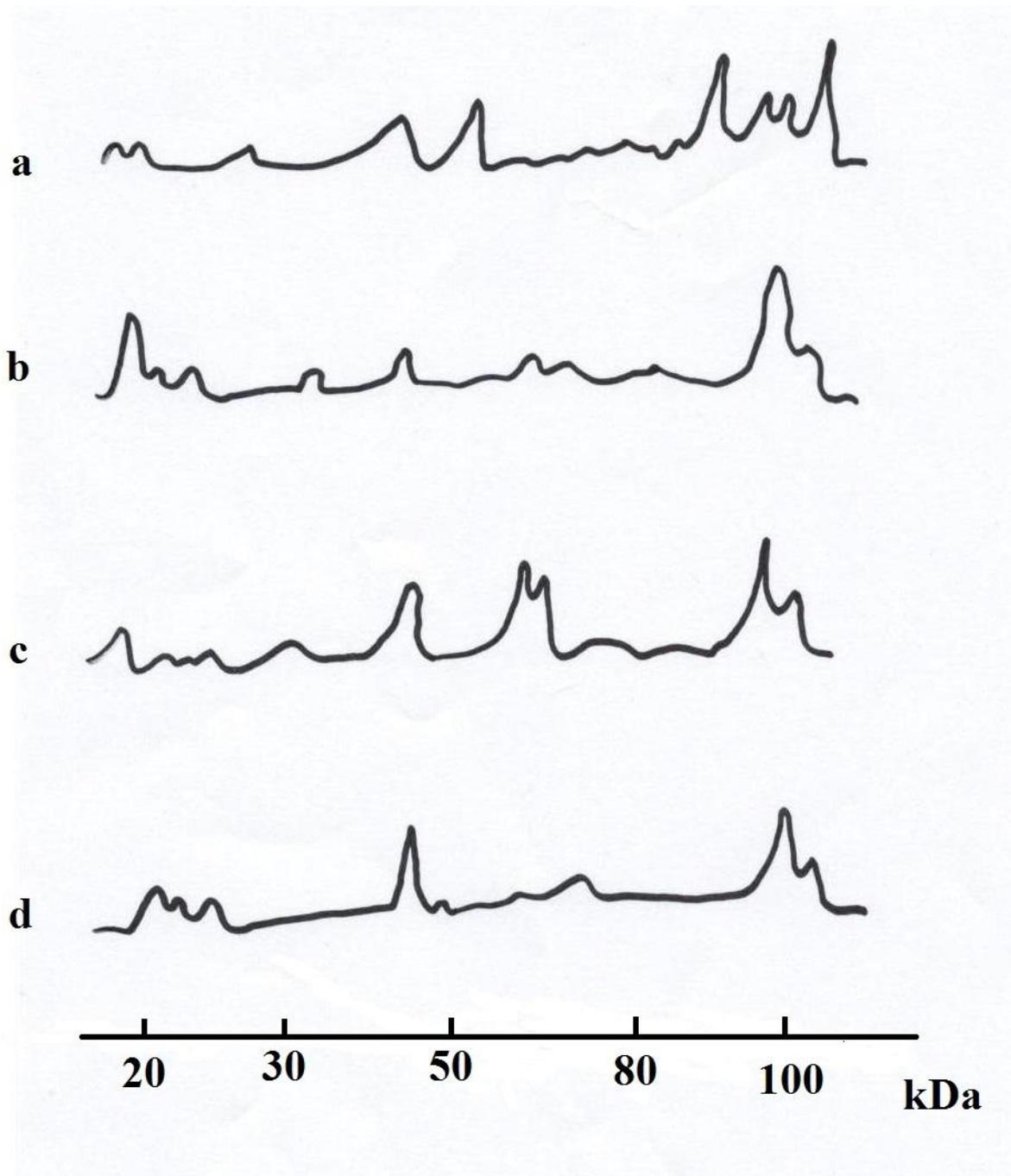
Митохондрии поставляют клетке продукты промежуточного метаболизма и действуют наряду с СР как депо ионов кальция, которые с помощью ионных насосов поддерживают концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме на постоянном низком уровне (ниже 1 мкмоль/л).

Изменение сродства к ионам кальция мембранными белками митохондрий миокарда (внутренние мембраны) при остром панкреатите претерпевают следующие изменения: высокомолекулярные белки, с о.м.м. 80-100 кДа, значительно изменяют сродство к ионам кальция (рис. 5) во все изученные сроки развития ОП. Действие ПБП на кальций связывающую способность белков внутренних мембран митохондрий особенно ярко проявляется к концу некротической стадии развития ОП (рис. 5). Однако, если сравнить изменения, происходящие в мембранных белках СР и М в отношении сродства к ионам кальция, заметим, что белки СР подвергаются более значительным сдвигам. Изменение физико-химических свойств этих белков и соответствующие им изменения в степени сродства мембранных белков СР и М настолько же разнонаправленны, насколько содержание  $^{45}\text{CaCl}_2$  в везикулах СР, а сдвиги в содержании кальция в М были менее заметны.

Как при ОП, так и при «синдроме длительного раздавливания», митохондрии миокарда остро реагируют на развитие этих двух патологий в степени сродства мембранных белков к ионам кальция. Действие ПБП проявляется в восстановлении этих утерянных свойств.

Как и в случае с патологией СДР, степень повреждения митохондрий идентична. Имея статистически четко и достоверно работающую программу по идентификации аффинности мембранных белков субклеточных структур кардиомиоцитов, а также основываясь на многочисленные биохимические и морфологические исследования вышеупомянутых двух патологий, вырисовывается доказательство о едином механизме развития инфаркта миокарда, каковым является пептидная интоксикация.

Радиогистограмма (рис. 8) показывает, что в геморрагической стадии развития панкреатита начинается заметное и достоверное повреждение миокарда (3 ч ОП). Все основные кальций связывающие белки митохондрий миокарда, кроме митохондриальной Са-АТФазы (о.м.м. 120 кДа), как и мембраны СР, теряют сродство к ионам кальция. Высокая кальций-связывающая способность белка с о.м.м. 15-20 кДа, по всей вероятности, можно объяснить высокой степенью агрегации фрагментов протеолиза мембранных белков при ОП. Начало некротической стадии развития ОП (24 ч ОП) характеризуется активацией механизмов биологической самозащиты миокарда, включением адаптогенных механизмов (Геворкян Г.А., 1998). Идентична картина прослеживается в клинике, когда в острый период развития панкреатита лишь 28-30% больных погибают от инфаркта миокарда. И, наконец, в стадии завершения развития некроза поджелудочной железы (72 ч ОП), сродство белков внутренних мембран митохондрий к ионам кальция, снова претерпевают ощутимые изменения (рис. 8, d).



**Рис. 8.** Радиогистограмма мембранных белков митохондрий при патологии ОП.

а. - интактные животные, б – 3 ч ОП, с - 24 ч ОП, d - 72 ч ОП.

5мм пика гистограммы соответствует 100 расп/мин.

### 3.6. Морфологическое изучение развития некроза миокарда

Развитие некротического повреждения миокарда при остром панкреатите и «синдроме длительного раздавливания», кроме наличия выраженных изменений биохимических параметров некротического повреждения миокарда, были подтверждены также проведением морфологических исследований.

Исследование состояния миокарда после 2 ч компрессии и 2 ч декомпрессии в период развития патогенеза СДР выявило следующие закономерности: в период декомпрессии стромы резко отечны, венозные сосуды расширены и полнокровны, имеются разного диаметра кровоизлияния в сторону миокарда (рис. 9). Повсеместно появляются преимущественно мелкие лимфогистиоцитарные скопления. Поперечная исчерченность кардиомиоцитов плохо контурируется. В саркоплазме папиллярных (сосочковых) мышц обнаруживаются много, преимущественно мелких, вакуолей (рис. 10). В субэндокардиальном слое миокарда наблюдаются миоцитолизис и фуксинофильная дистрофия кардиомиоцитов. Повсеместно обнаруживаются контрактуры. В субэндокардиальном и местами среднем слоях в стенке левого желудочка обнаружены кардиомиоциты содержащие зерна гликогена. Стенки артерий в состоянии плазматического пропитывания. Представлены кровоизлияния в сторону миокарда, видны очаговые лимфогистиоцитарные инфильтрации, вакуолизация саркоплазмы кардиомиоцитов, сосочковые мышцы левого желудочка, видны миоцитолизис и фуксинофильное изменение субэндокардиального слоя миокарда, в стенке левого желудочка (рис. 11).

После введения ПБП была выявлена следующая морфологическая картина. Отек стромы выражен менее интенсивно, чем у нелеченых животных. Расширенные и полнокровные вены замечены только в субэпикардиальной зоне. Кровоизлияния не обнаружены. Отсутствуют лимфогистиоцитарные инфильтранты. В саркоплазме кардиомиоцитов поперечная исчерченность преимущественно сохранена. Выявляются редкие контрактуры и миоцитолизис (рис. 12, 13). В стенке левого желудочка определяется мелкий очаг миолиза с перифокальной макрофагальной реакцией. Обнаружены единичные кардиомиоциты в состоянии фуксинофильной

дистрофии. Немногочисленные зерна гликогена выявлены в саркоплазме кардиомиоцитов исключительно в субэпикардальной зоне. Значительно уменьшается, по сравнению с нелечеными животными, число кардиомиоцитов с гиперхромными пикнотичными ядрами. Обнаруживаются кардиомиоциты с гипертрофированными, местами удлинненными ядрами (рис. 14).

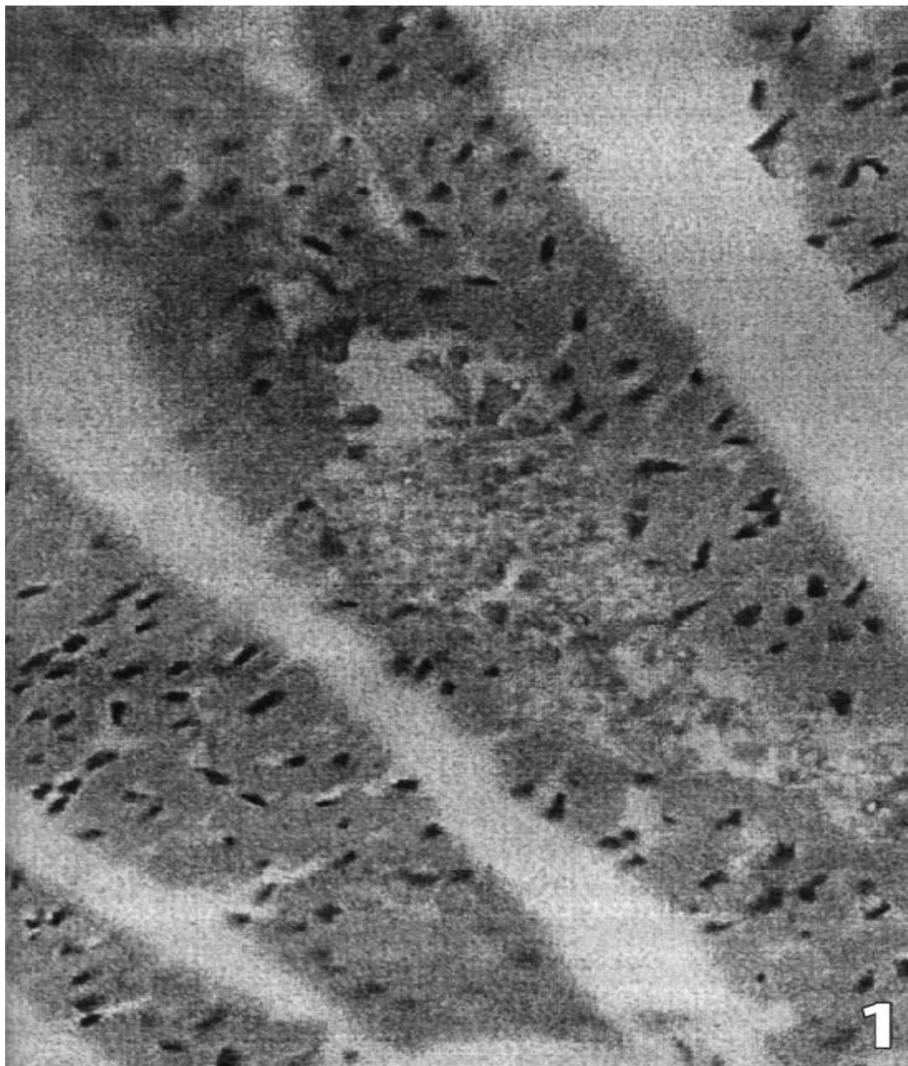


Рис. 9 Очаговый лимфоцитарный инфильтрат  
(гематоксилин, ув. 400X).



Рис. 10. Вакуоляция саркоплазмы кардиомиоцитов  
(гематоксилин, ув. 1000X).

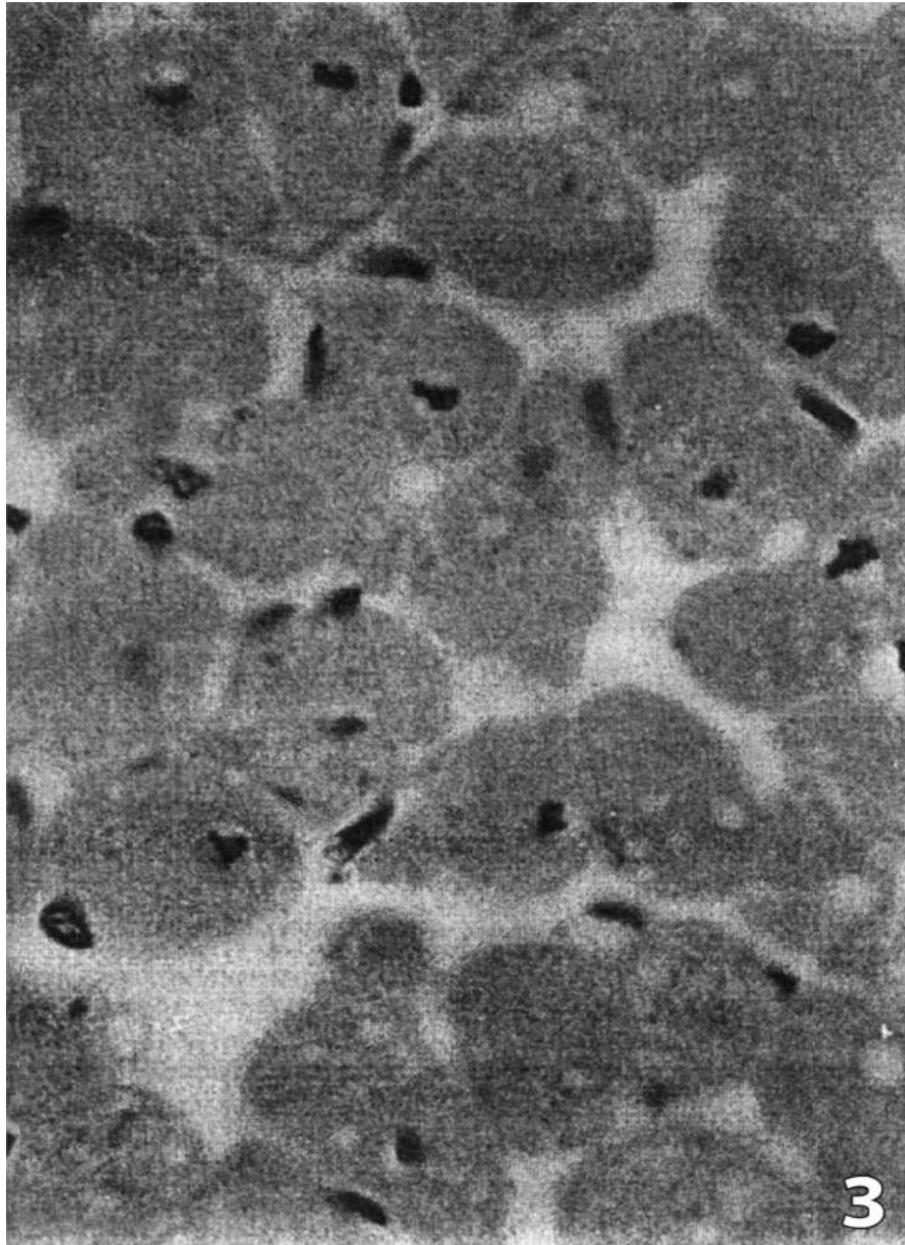


Рис. 11. Миоцитолиз стенки левого желудочка  
(фуксином, ув. 1000X).

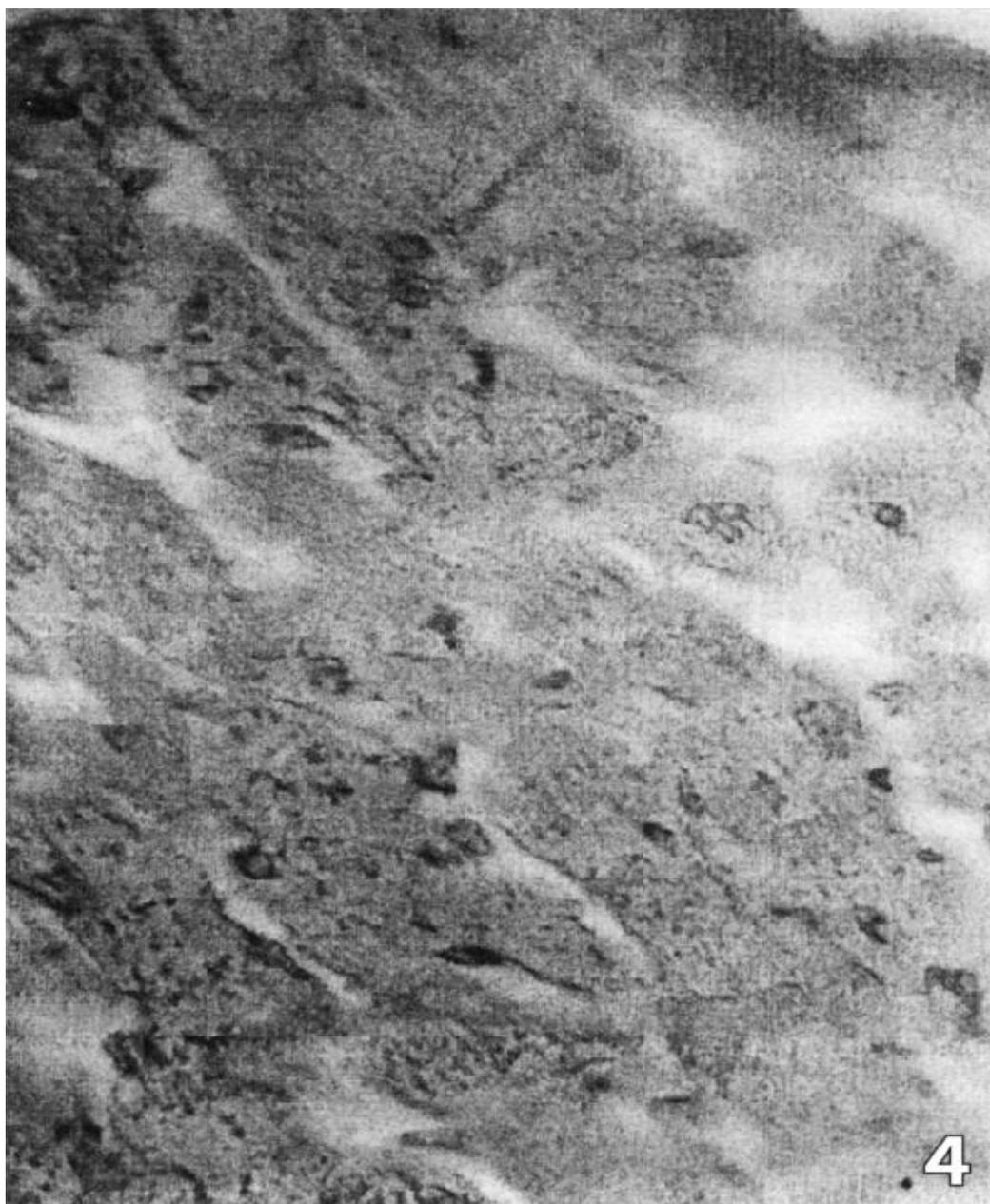


Рис.12. Гипертрофические кардиомиоциты с удлинёнными ядрами (гематоксилин, ув. 400X).

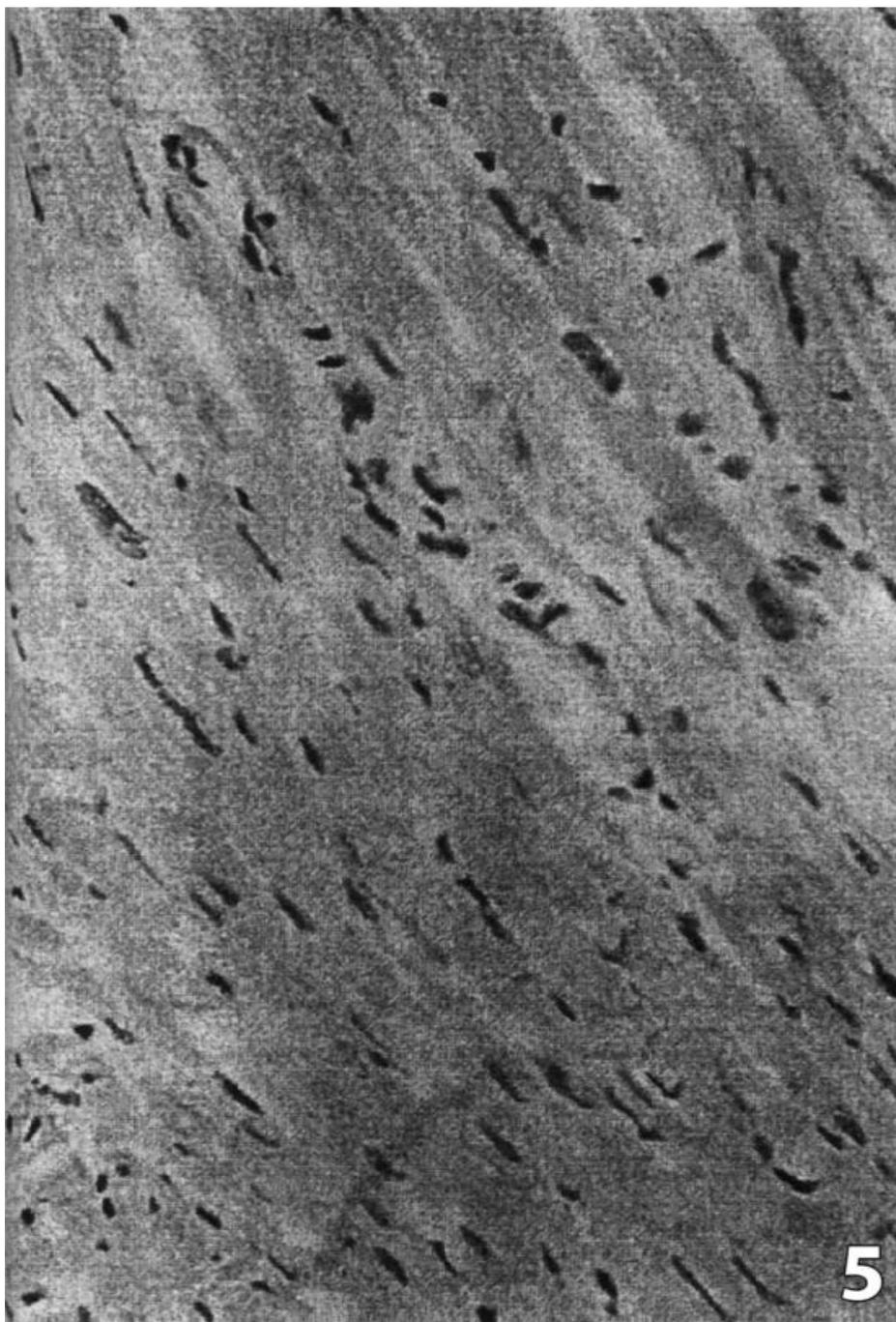


Рис. 13. Контрактура и дегенерация кардиомиоцитов  
(гематоксилин, ув. 1000X).

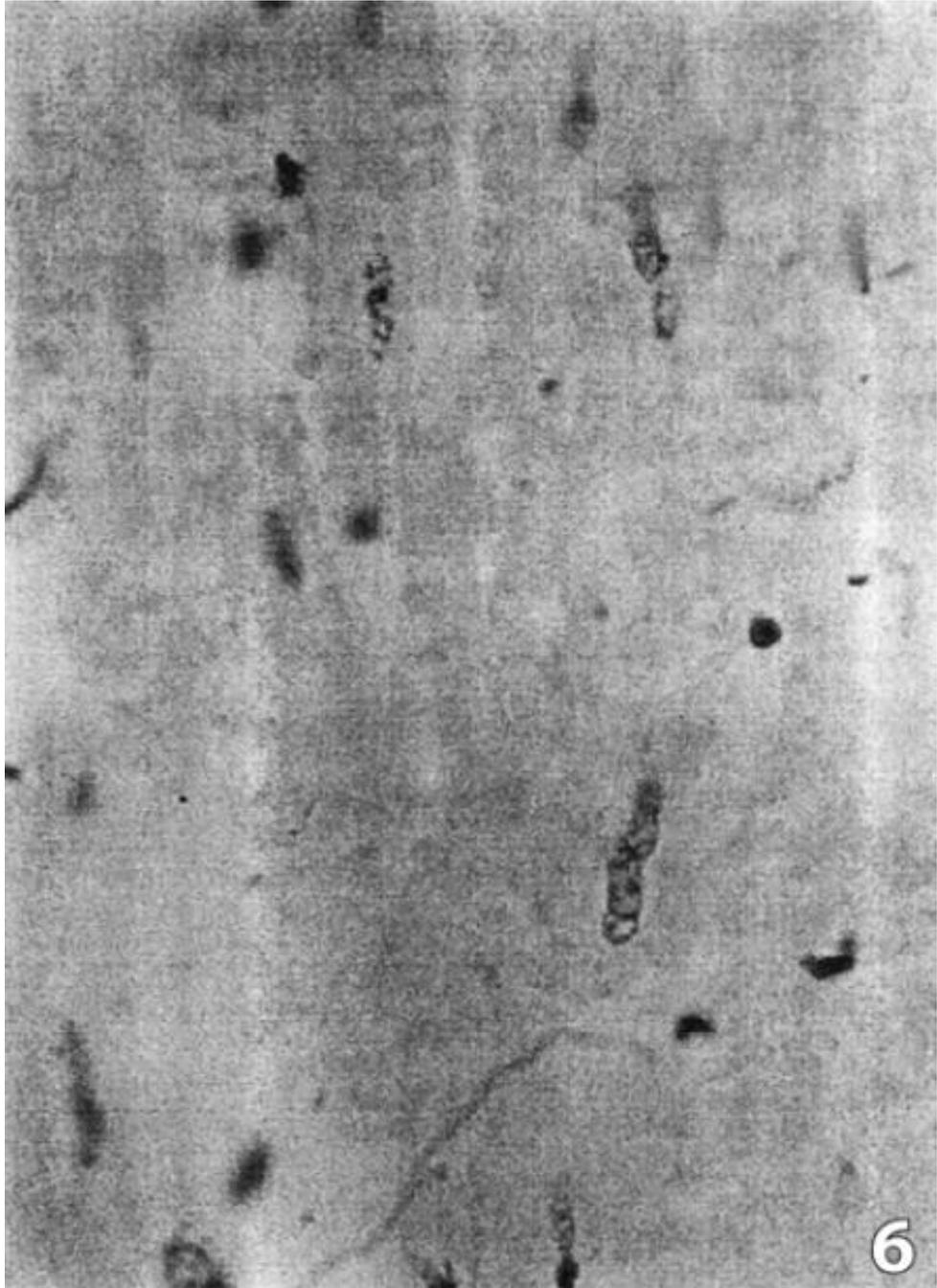


Рис. 14. Перинуклеарный миоцитолис (по Селье, ув. 1000X)

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Повреждение миокарда, инфаркт и высокая смертность среди населения призывают к более тщательному и скрупулезному изучению поднятой нами проблемы и вытекающих из нее причинно-следственных отношений.

После того, как французский ученый А. Лефер (Lefere A.M., 1982) показал развитие повреждения миокарда и смертность (до 32-35 %) у пациентов с патологией острого панкреатита (ОП), как следствие многочисленных других патологий, встал вопрос более подробного изучения развития ОП. Исследования, развернутые в отделе «патологической биохимии» по изучению патогенеза ОП, а также тестирование гипоталамических биологически активных соединений «нейрогормона С» и «пролином богатого пептида» открытые акад. А. Галояном показали, что такое системное заболевание, каковым является ОП, поддается лечению этими препаратами. Так, возросшая до 10-12 раз выше нормы активность альфа-амилазы, через 12-16 часов после введения наших препаратов, опускалась почти до интактного уровня.

Продолжая изучения путей повреждения миокарда, мы натолкнулись на патологию «синдрома длительного раздавливания» или Краш-синдром, впервые описанный английским врачом Биватерсом после «Лондонского блица» в 1941 году, сопутствующий раздавленными под тяжестью мягкими тканями человека и животных как, например, под завалами после землетрясений, бомбежек, техногенных аварий и т.д. (Bywaters E. G., 1941). Разработка модели воссоздания этой патологии на белых крысах, позволили нам подробно изучить и сопоставить ОП и СДР.

Нам был известен механизм повреждения вплоть до развития инфаркта миокарда. Ишемизированная поджелудочная железа выбрасывает в кровяное русло октапептид, который накапливаясь в миокарде, в некротической стадии развития ОП (24-72 ч), приводит к инфаркту миокарда.

При СДР имеет место раздавливание мышечной ткани, а следовательно и миоглобина, который в анаэробных условиях, при образовавшихся ранах, микробном заражении, который сопровождается активацией протеолиза и

образования многочисленных пептидных фрагментов миоглобина. Среди этих фрагментов были определены 4 токсических пептида, состоящих из 4, 5, 7 и 9 аминокислот (Kevorkian G.A. et al., 2003).

При введении экспериментальным животным (в основном белые крысы линии Wistar) фрагмента миоглобина – нонапептида, получаем сопоставимое с картиной при ОП, некротическое повреждение миокарда, инфаркт и гибель животных.

Сопоставляя аминокислотный состав окта- и нонапептидов, было определено, что аминокислотный состав октапептида полностью повторяется в составе нонапептида за исключением 9-ой аминокислоты – аргинина. Таким образом, эти два пептида различаются наличием аргинина в составе нонапептида. Однако степень повреждения миокарда абсолютно повторяет картину повреждения двумя пептидами. Идентичность наблюдается также при сравнении морфологических картин повреждения миокарда.

Сравнивая степень транслокации ионов кальция в кардиомиоцитах, их сродство к мембранным белкам CP и M миокарда, была зарегистрирована идентичность картины по метаболизму ионов кальция. Идентичность повреждения миокарда при двух, совершенно различных патологиях, заключается в идентичности природы поражающего миокард токсина. Таковыми являются различные по природе возникновения – токсические пептиды, отличающиеся лишь одной аминокислотой, но одинаковые по повреждающему действию на миокард.

Изучение сродства мембранных белков по отношению к ионам кальция становится возможным применяя графики Скетчарда для определения аффинности кальция с использованием радиолиганда –  $^{45}\text{CaCl}_2$ .

Разработка компьютерной программы расчета величины специфического связывания с использованием радиолиганда и применением графиков Скетчарда, выполненная в рамках настоящей диссертационной работы, повышает достоверность полученных результатов (до коэффициента корреляции графика 90% и с достоверностью  $\sigma_t = 92\%$ ), и намного, в 10-15 раз, ускоряет обработку полученных данных.

Суть метода заключается в использовании радиолиганда  $^{45}\text{CaCl}_2$ , вводимого экспериментальным белым крысам линии Wistar в условиях *in vivo*, а также

инкубирование мембран саркоплазматического ретикула (СР) и митохондрий (М) в условиях *in vitro*.

Поскольку кардиомиоциты и его субклеточные образования, в частности СР и М, при некротическом повреждении структуры миокарда претерпевают серьезные биохимические и морфологические изменения, необходимо проведение многосторонних исследований о нарушенных звеньях метаболизма и изыскание путей целенаправленного воздействия для корректировки повреждений.

Так, как при остром панкреатите, так и при «синдроме длительного раздавливания», были зафиксированы серьезные нарушения в сродстве ионов кальция мембранными белками СР и М. Следует особенно отметить нарушения, зафиксированные в мембранах СР. Необходимо также особо отметить схожесть повреждений при двух изученных патологиях – ОП и СДР. Картины повреждения миокарда абсолютно одинаковы. Мембраны СР, с развитием этих двух патологий, теряют сродство к ионам кальция. Особенно это явление прослеживается в отношении кальсеквестрина, белка с о.м.м. 55 кДа. Этот процесс приводит к наполнению везикул СР свободным кальцием в количестве примерно 290 нМ и усиливает ток выброса ионов Са везикулами СР. Уменьшение концентрации ионов кальция ниже <300 нМ приводит к процессу «текучести» мембран. При таких условиях, СР ослабляет, или теряет полностью, свою способность к регуляции сократимости миокарда. В такой тяжелой, аварийной ситуации, система самозащиты СР и миокарда в целом, включает системы замены кальсеквестрина другим мембранным белком СР, а именно изменением сродства белка с о.м.м. 32 кДа, к ионам Са. Этот белок у интактных животных проявляет абсолютную нейтральность к ионам кальция. Причем доказано, что этот белок не претерпевает количественных изменений. Изменяется точка изофокусировки – рН белка с 8,3-8,4, снижается в кислую сторону – 6,8-6,9. Происходит изменение физико-химической характеристики этого, за счет которой проявляется новое свойство. Происходит замена около 15-17% структурных аминокислот на аминокислоты кислого характера - аспарагиновую и глутаминовую кислоты (Guevorgyan A.G., 2014).

Мембранные белки СР, а именно 5 кислых белков, кальсеквестрин и Са-АТФаза, которые определяют структурную и функциональную целостность и

предотвращают гибель СР и миокарда в целом, при патологии подвергаются серьезным изменениям. Кроме Са-АТФ азы, которая повреждается примерно на 10-15%, все остальные белки подвергаются более заметным повреждениям. Белок с о.м.м. 32 кДа полностью компенсирует сохранность кальция в СР при ОП и СДР. Введение гипоталамического цитокина – ПБП, заметно корректирует утраченное сродство к ионам кальция. Применяя метод подсчета сродства к ионам кальция в графиках Скетчарда, удалось доказать, что в более поздние сроки развития ОП и СДР, когда классические кальций-связывающие белки восстанавливают свои характеристики, белок с о.м.м. 32 кДа теряет приобретенное сродство к кальцию при патологии, восстанавливая свою как структуру, так и функцию.

Подобные изменения происходят и с мембранными белками митохондрий, однако эти изменения не столь глубоки, чтобы нарушить митохондриальный синтез АТФ, а проблема потери сродства к ионам кальция не дополняется глубоким энергетическим кризисом.

Повреждающее влияние на миокард, как было уже показано, проявляют два пептида – «миокард депрессирующих факторов». Это октапептид, открытый и описанный А. Лефером (Lefer A., 1987) и нонапептид, описанный А. Геворкяном (Guevorgyan. A., 2014). Эти два пептида повторяют структуру по 8 аминокислотам, а 9-ая аминокислота у нонапептида, которую представляет аргинин, позволяет ему проникать через гемато-энцефалический барьер в мозг. Такие пептиды, проходящие в мозг, названы «аргинино-белки», которые, попадая в мозг, вызывают повреждение и развитие болезни Альцгеймера.

Следует еще раз подчеркнуть практическое значение применения графиков Скетчарда, особенно метод компьютерной, быстрой обработки результатов.

В клиниках, при лечении пациентов, необходим экспресс анализ воздействия того или иного препарата, для чего необходимо удостовериться, что данный препарат вошел в контакт с поврежденным органом и тканью. Данные по выявлению специфически связанного препарата и биологического материала, могут дать необходимые для успешного лечения информацию и даже послужить определению необходимой минимальной дозы используемого препарата. Например, применение пептидных препаратов, которые сегодня занимают все большую и большую

распространенность. Как правило, они являются нейтральными сами по себе, и, как правило, применяются с положительно заряженными остатками лизина, чтобы увеличить их растворимость и аффинность связывания. Шведскими учеными из Каролинского университета удалось найти необходимые концентрации применения лекарственных препаратов. На пленарном заседании Европейского биохимического общества в Париже (FEBS, Paris 2014) был сделан доклад о разделении людей на 5 групп по чувствительности того или иного препарата. Разница между самой чувствительной и менее чувствительными группами пациентов составила до 1000 раз. Следовательно, применяя метод специфического связывания препарата в поврежденном участке организма, может помочь в снижении дозы необходимого препарата. Особенно важное место эти исследования занимают при лечении онкологических больных, которым назначается химиотерапия. Применяя при лечении таких больных препараты очень токсические. Применяя метод специфического связывания химиопрепаратов с раковым участком можно максимально, без ущерба курса лечения, снизить концентрацию лекарства без дополнительных повреждений наносимых этими препаратами.

Многочисленными биохимическими и морфологическими исследованиями на экспериментальных моделях повреждения миокарда при патологиях различной этиологии в «отделе патологической биохимии» Института биохимии НАН им. Г. Бунятына были получены убедительные результаты по положительному влиянию «пролином богатого пептида» (ПБП) по коррекции нарушенных биохимических и морфологических механизмов и структур. Соответствующая организация РА утвердила предклиническое испытание препарата. Исследования, проведенные в рамках настоящей диссертационной работы, помогут дальнейшему использованию гипоталамического цитокина ПБП в клинической практике.

## ВЫВОДЫ

1. Разработка компьютерной программы для подсчета сродства радиолиганда с рецепторами открывают новые пути быстрого и достоверного исследования лиганд-рецепторного комплекса.
2. Обработка результатов расчета графика Скетчарда по специфическому связыванию ионов кальция резко повышает достоверность полученных результатов и сокращает время их обработки.
3. Сдвиги в аффинности мембранных белков СР и М к ионам кальция связаны с изменениями физико-химических характеристик этих белков. Изменение кислотности у мембранного белка СР с о.м.м. 32 кДа при СДР проявляет новое свойство – выраженное сродство к ионам кальция.
4. Изучение концентраций применения меченого, «горячего», лиганда и немеченого, «холодного» лиганда показали, что соотношение этих двух лигандов должны составлять 1:100.
5. Гипоталамический цитокин ПБП проявляет антиоксидантное свойство и защищает миокард при его реперфузии.
6. Используя биоптат больного онкологией и применяя программу экспресс определения специфического связывания можно определить минимальную дозу препаратов химиотерапии, тем самым снижая их токсичность.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Геворкян Г. А. Регуляторное влияние нейrogормона «С» на метаболизм миокарда при изопротереноловом повреждении и панкреонекрозе. // Диссертация на уч. степень доктора биол. наук. 1998; Ереван.
2. Канаян А.С. Патологическая анатомия и патогенез панкреатита. // Диссертация доктора медицинских наук. 1984; Ереван.
3. Симаворян П.С. Некоторые аспекты патофизиологии панкреатитов. // Диссертация доктора медицинских наук. 1973; 355 с.; Ереван.
4. Чернух А.М., Коптева Л.А. Белоксинтезирующая активность и некоторые характеристики белков внутренних мембран митохондрий миокарда крыс с диссеминированным некротическим поражением сердца. // «Медицина», «Метаболизм миокарда». 1997; с. 329-338.
5. Allbritton N.L., Meyer T., Stryer L. Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate // Science 258. 1992, p. 1812–1815.
6. Arredouani A. - Diversification of function and pharmacology in intracellular Ca<sup>2+</sup> signalling. 2004, Cell Science Rev., 1, 30–79.
7. Ashraf M., Suleiman J., Ahmad M. Ca<sup>2+</sup> preconditioning elicits a unique protection against the Ca<sup>2+</sup> paradox injury in rat heart. Role of adenosine. // Circ. Res. 1994; 74(2); p. 360 – 367.
8. Baaske P, Wienken C.J., Reineck P., Duhr S., Braun D. Optical Thermophoresis quantifies Buffer dependence of Aptamer Binding. // Angew. Chem. Int. Ed. 2010; 49 (12); p. 1–5.
9. Baron R., Setny, P., Mccammon A. J. Water in Cavity-Ligand Recognition. // Journal of the American Chemical Society. 2010; 132 (34); p. 12091–12097.
10. Bers D.M. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. // Ann. Rev. Physiol. 2008; 70; p. 23-49.
11. Barros T.E.P., Araujo F.F., da Paz Higino L., Marcon R.M, Cristante A.F. The effect of monosialogangl yosidi (GM-1) administration in spinal cord injury. // Acta Ortop Bras. 2016; 24(3); p. 123–126.

12. Berridge M.J. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. // *Cell Calcium* 32. 2002; 32(5-6); p. 235–249.
13. Better O.S., Abassi Z.A. Early fluid resuscitation in patients with rhabdomyolysis. // *Nat Rev Nephrol*. 2011; 7(7); p. 416–422.
14. Bezprozvanny I. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. // *Cell Calcium* 38. 2005; p. 261–272.
15. Boehning D., Mak D.O., Foskett J.K., Joseph S.K. Molecular determinants of ion permeation and selectivity in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor  $Ca^{2+}$  channels. // *J. Biol. Chem*. 2001; 276; p. 13509–13512.
16. Bosch X., Poch E., Grau J.M. Rhabdomyolysis and acute kidney injury. // *New England Journal of Medicine*. 2009; 361(1); p. 62–72.
17. Bywaters E.G., Beall D. Crush injuries with impairment of renal function. // *Br Med J*. 1941; 1(4185); p. 427–432.
18. Bywaters E.G.L. Ischaemic muscle necrosis. // *J Am Med Assoc*. 1944; 124; p. 1103–1109.
19. Capiod T., Haiech J., Heizmann C.W., Krebs J., Mignen O. Calcium and Cell Fate. // *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1863 (6 Pt B); p. 1335-1336.
20. Carrasco M.A., Jaimovich E., Kemmerling U., Hidalgo C. Signal transduction and gene expression regulated by calcium release from internal stores in excitable cells. // *Biol. Res*. 2004; 37; p. 701–712.
21. Curry W.J., Johnston C.F., Hutton J.C., Arden S.D., Rutherford N.G., Shaw C., Buchanan K.D. The tissue distribution of rat chromogranin A-derived peptides: evidence for differential tissue processing from sequence specific antisera. // *Histochemistry*. 1991; 96(6); p. 531-538.
22. da Rosa R., de Moraes M.H., Zimmermann L.A., Schenkel E.P., Steindel M., Bernardes L.S. Design and synthesis of a new series of 3,5-disubstituted isoxazoles active against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. // *Eur J Med Chem*. 2017; 128; p. 25-35.
23. Davis T.N. What is new with calcium? // *Cell*. 1992; 71(4); p. 557 – 564.

24. Egelhaaf M., Kern R., Lindemann J.P. Motion as a source of environmental information: a fresh view on biological motion computation by insect brains. // *Front Neural Circuits*. 2014; 8; p. 127.
25. Eisner D.A., Kashimura T., O'Neill S.C., Venetucci L.A., Trafford A.W. What role does modulation of the ryanodine receptor play in cardiac inotropy and arrhythmogenesis? // *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2009; 46; p. 474 – 481.
26. Fill M., Copello J.A. // Ryanodine receptor calcium release channels. // *Physiol. Rev*. 2002; 82; p. 893 – 922.
27. Foskett J.K., White C., Cheung K.H., Mak D.O. Inositol trisphosphate receptor Ca<sup>2+</sup> release channels. // *Physiol Rev*. 2007; 87; p. 593–658.
28. Frank K., Kranias E.G. Phospholamban and cardiac contractility. // *Ann Med*. 2000; 32(8); p. 572 – 578.
29. Galoyan A.A. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. // *Neuroimmunology*. 2002; 12.
30. Galoyan A.A. *Brain Neurosecretory Cytokines: Immune Response and Neuronal Survival*. // Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. 2004; p. 188.
31. Gillen C., Jander S, Stoll G. Sequential expression of mRNA for proinflammatory cytokines and interleukin-10 in the rat peripheral nervous system: comparison between immune-mediated demyelination and Wallerian degeneration. // *J Neurosci Res*. 1998; 51(4); p. 489 – 496.
32. Gonzalez S., Berthelot J., Jiner J., Perrin-Tricaud C., Fernando R., Chrast R., Lenaers G., Tricaud N. Blocking mitochondrial calcium release in Schwann cells prevents demyelinating neuropathies. // *J Clin Invest*. 2016; 126(3); p. 1023 – 1038.
33. Gordan L., Grogg A., Blazer M., Fortner B. Unintended Consequences in Cancer Care Delivery Created by the Medicare Part B Proposal: Is the Clinical Rationale for the Experiment Flawed? // *Journal of Oncology Practice*. 2016; 13(2); 139 – 151.
34. Gordan R., Fefelova N., Gwathmey J.K., Xie L.H. Involvement of mitochondrial permeability transition pore (mPTP) in cardiac arrhythmias: Evidence from cyclophilin D knockout mice. // *Cell Calcium*. 2016; 60(6); p. 363 – 372.

35. Gordon L.M., Sauerheber R.D. Calcium and membrane stability. The role of calcium in biological systems. CRC Press Inc., USA; 1982; p. 3 – 16.
36. Guevorkian A. G. Alterations in Calcium-Binding Properties of Sarcoplasmic Reticulum Membrane Proteins Following Cardiac Injury. // International Journal of Biochemistry Research & Review. 2014; 4(6); p. 574 – 583.
37. Guevorkian A.G., Kanayan A.S., Chailian G.S., Danielyan K.E., Hayrapetyan H.L., Barsegyan K.A., Khachatryan H.F., Galoyan A.A., Kevorkian G.A. The influence of hypothalamic cytokine PRP on protein synthesis in brain subcellular compartments in crush syndrome. // Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem. 2011; 11(3); p. 184-188.
38. Gwathmey J.K., Yerevanian A., Hajjar R.J. Targeting sarcoplasmic reticulum calcium ATPase by gene therapy. // Hum. Gene Ther. 2013, 24(11); p. 937 - 947.
39. Hatase O., Itano T., Matsui H., Doi. A., Etoh. S., Nishio H., Nakahara S. A possible role for calmodulin in  $Ca^{2+}$  - induced swelling of mitochondria. // Biochem. Inter. 1987; 15(4); p. 793 - 799.
40. Heizmann C.W. (Editor). Novel calcium-binding proteins // Springer-Verlag Publ., 1991, p. 611.
41. Hertle D.N., Yeckel M.F. Distribution of inositol-1,4,5-trisphosphate receptor isotypes and ryanodine receptor isotypes during maturation of the rat hippocampus. // Neuroscience. 2007; 150; p. 625–638.
42. Hoppel C., Cooper C. An improved procedure for preparation of inner membrane vesicle from treatment with digitonin. // Arch. Bioch. Bioph. 1969; 138(1-2); p. 173 - 183.
43. Huerta-Alardín A.L. & Varon J, Marik P.E. Bench-to-bedside review: rhabdomyolysis – an overview for clinicians. // Critical Care. 2005; 9(2); p. 158 – 169.
44. Hughes C.B., el-Din A.B., Kotb M., Gaber L.W., Gaber A.O. Calcium channel blockade inhibits release of TNF alpha and improves survival in a rat model of acute pancreatitis. // Pancreas. 1996; 13(1); p. 22 – 28.

45. Furuichi T., Furutama D., Hakamata Y., Nakai J., Takeshima H., Mikoshiba K. Multiple types of ryanodine receptor/Ca<sup>2+</sup> release channels are differentially expressed in rabbit brain. // *J. Neurosci.* 1994; 14; p. 4794 – 4805.
46. James G., Butt A.M. P2Y and P2X purinoceptor mediated Ca<sup>2+</sup> signalling in glial cell pathology in the central nervous system. // *Eur. J. Pharmacol.* 2002; 447; p. 247 – 260.
47. Jander S, Schroeter M, Stoll G. Interleukin-18 expression after focal ischemia of the rat brain: association with the late-stage inflammatory response. // *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002; 22(1); p. 62 – 70.
48. Jessen KR, Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2005; 6(9); p. 671 – 682.
49. Katsumata M., Baker M.K., Goldman A.S. A method of curve fitting analysis for cooperative-type Scatchard plots. // *J. Biochem.* 1979; 86(4); p. 963 – 970.
50. Kawano T, Kataoka H, Nagasawa H, Isogai A, Suzuki A. Molecular cloning of a new type of cDNA for pheromone biosynthesis activating neuropeptide in the silkworm, *Bombyx mori*. // *Biosci Biotechnol Biochem.* 1997; 61(10); p. 1745 – 1747.
51. Kerner T., Vollmar B., Menger M.D., Waldner H., Messmer K. Determinants of pancreatic microcirculation in acute pancreatitis in rats. // *J. Surg. Res.* 1996; 62(2); p. 165 – 171.
52. Kevorkian G., Kanayan A., Hayrapetyan H., Guevorkian A., Melkonyan L., Galoyan A. Necrotic injury of a myocardium at the experimental crush syndrome and an opportunity of its treatment. // *The FEBS Journal.* 2006; 273; p. 663.
53. Kevorkian G.A., Kanayan A.S., Hayrapetyan H.L., Guevorkian A.G., Marukhyan G.L., Avanesyan S.A., Manukyan L.A., Voskanian L.H., Galoyan A.A. Metabolic activity of proline rich peptide (PRP) on brain. // *Neurochemistry.* 2002; 19(4); p. 297 – 303.
54. Kevorkian G.A., Marukhyan G.L., Arakelyan L.N., Guevorkian A.G., Galoyan A.A. Influence of the hypothalamic proline rich peptide on the level of <sup>14</sup>C-Glucose utilization during crush syndrome. // *Neurochem. Res.* 2001; 26(7); p. 827 – 830.

55. Kevorkian G.A., Guevorkian A.G., Kukurchyan N.S., Galoyan A.A. Experimental crush syndrome and brain injury. // J. of Neurochemistry. 2003; 87(1); p. 145 – 149.
56. Kim Hue Su, Christine Cuthbertson, Christopher C. Review of experimental animal models of acute pancreatitis. // HPB Oxford. 2006; 8(4); p. 264 – 286.
57. Kirichok Y., Krapivinsky G., Clapham D.E. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. // Nature. 2004; 427(6972); p. 360 – 364.
58. Kirchberger M.A, Antonetz T. Calmodulin-mediated regulation of calcium transport and (Ca<sup>2+</sup> - Mg<sup>2+</sup>) – activated ATPase activity in insolated cardiac sarcoplasmic reticulum. // J. Biol. Chem. 1982; 257; p. 5685 – 5691.
59. Kojima A., Kitagawa H., Omatsu-Kanbe M., Matsuura H., Nosaka S. Ca<sup>2+</sup> paradox injury mediated through TRPC channels in mouse ventricular myocytes. // Br. J. Pharmacol. 2010; 161(8); 1734 – 1750.
60. Kretsinger R.H. Hypothesis: calcium modulated proteins contain EF-hands. // E.Carafoli (ed), Calcium transport in contraction and secretion. 1975; p. 469 – 478.
61. Kumar SM, Porterfield DM, Muller KJ, Smith PJ, Sahley CL. Nerve injury induces a rapid efflux of nitric oxide (NO) detected with a novel NO microsensor. // J. Neurosci. 2001; 21(1); p. 215 – 220.
62. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. // Nature. 1970; 227(2); p. 680 – 685.
63. Lamberts R., Schmidt W.E., Creutzfeldt W. Light and electron microscopical immunocytochemical localization of pancreastatin-like immunoreactivity in porcine tissues. // Histochemistry. 1990; 93(4); p. 369 – 380.
64. Le Peuch C.J., Guilleux J.C., Demaille J.G. Phospholamban phosphorylation in the perfused rat heart is not solely dependent on beta-adrenergic stimulation. // FEBS Lett. 1980; 114; p. 165 – 168.
65. Lee M.Y., Park C., Ha S.E., Park P.J., Berent R.M., Jorgensen B.G., Corrigan R.D., Grainger N., Blair P.J., Slivano O.J., Miano J.M., Ward S.M., Smith T.K., Sanders K.M., Ro S. Serum response factor regulates smooth muscle

- contractility via myotonic dystrophy protein kinases and L-type calcium channels. // PLoS One. 2017; 12(2); p. 354 – 362.
66. Lefer A.M., Barenholz Y. Pancreatic hydrolases and the formation of a myocardial depressant factor in shock. // Am. J. Physiol. 1972; 223(5); p. 1103 – 1109.
  67. Lefer A.M., Glenn T.M. Role of the pancreas in the pathogenesis of circulatory shock. // Adv. Exp. Med. Biol. 1971; 23(0); p. 311 – 335.
  68. Lefer A.M. & Martin J. Relationship of Plasma Peptides to the Myocardial Depressant Factor in Hemorrhagic Shock in cats. // Circ Res. 1970; 26; p. 59 – 69.
  69. Lefer A.M. Interaction between myocardial depressant factor and vasoactive mediators with ischemia and shock. // Am. J. Physiol. 1987; 252(2 Pt 2); p. 193 – 205.
  70. Lefer A.M. The pathophysiologic role of myocardial depressant factor as a mediator of circulatory shock. // Klin. Wochenschr. 1982; 60 (14); p. 713 – 716.
  71. LEM-II. Computer language, user's manual. Ref. 1-75-501. 2nd Edition. // Interneknique Publ.1977; France.
  72. Levy D., Kenchaiah S., Larson M.G., Benjamin E.J., Kupka M.J., Ho K.K., Murabito J.M., Vasan R.S. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. // N. Engl. J. Med. 2002; 347(18); p. 1397 – 1402.
  73. Lindemann J.P., Jones L.R., Hathway D.R. Beta adrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and  $Ca^{2+}$  - ATPase activity in guinea pig ventricles. // J. Biol. Chem. 1983; 258; p. 464 – 471.
  74. Maack C., Cortassa S., Aon M.A., Ganesan A.N., Liu T., O'Rourke B. Elevated cytosolic  $Na^{+}$  decreases mitochondrial  $Ca^{2+}$  uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes. // Circ. Res. 2006; 99; p. 172 – 182.
  75. Mak D.O., Foskett J.K. Single-channel kinetics, inactivation, and spatial distribution of inositol trisphosphate (IP3) receptors in *Xenopus* oocyte nucleus. // J. Gen. Physiol. 1997; 109; p. 571 – 587.

76. Mackrill J.J. Ryanodine receptor calcium channels and their partners as drug targets. // *Biochem. Pharmacol.* 2010; 79; p. 1535 – 1543.
77. MacLennan D.H. & Kranias E.G. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2003; 4; p. 566 – 577.
78. Mandal A. Acute Pancreatitis Pathogenesis. // *News Medical Life sci.* 2017.
79. Mendel C.M., Mendel D.B. Non-specific binding. The problem and a solution. // *Biochem. J.* 1985; 228(1); p. 269 – 272.
80. Menge T., Jander S., Stoll G. Induction of the proinflammatory cytokine interleukin-18 by axonal injury. // *J. Neurosci. Res.* 2001; 65(4); p. 332 – 339.
81. Michaelson M. Crush Injury, Crush Syndrome. Chapter in *Essentials of Terror Medicine.* Shapira Sh. C., Hammond J.S., Leonard A. Cole L.A. (Eds.). Springer New York, 2009. pp 337-346.
82. Mitsumoto H., Santella R., Liu X. Oxidative stress biomarkers in sporadic ALS. // *Amyotrophic Lateral Sclerosis.* 2008; 9; p. 177 – 183.
83. Nayler W.G. Review of preclinical data of calcium channel blockers and atherosclerosis. // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1999; 33(2); p. 7 – 11.
84. O'Connor D.T. Pancreastatin: Multiple Actions on Human Intermediary Metabolism in Vivo, Variation in Disease, and Naturally Occurring Functional Genetic Polymorphism. // *Oxford Academic.* 2005; 90(9); p. 5414 – 5425.
85. Peng T. I. & Jou M.J. Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2010; 1201; p. 183 – 188.
86. Pezzilli R., Billi P, Miniero R., Barakat B. Serum interleukine -10 in human acute pancreatitis. // *Dig. Dis. Sci.* 1996; 42(7); p. 1469 – 1472.
87. Poduslo J.F., Walikonis R.S., Domec M.C., Berg C.T., Holtz-Heppelmann C.J. The second messenger, cyclic AMP, is not sufficient for myelin gene induction in the peripheral nervous system. // *J. Neurochem.* 1995; 65(1); p. 149 – 159.
88. Ponce-Hornos J.E., Bonazzola P., Marengo F.D., Consolini A.E., Marquez M.T. Tension-dependent and tension-independent energy components of heart contraction. // *Pflugers Arch.* 1995; 429(6); p. 841 – 851.

89. Purcaru F., Ghelase F., Gugik I., Curc T., Neme R., Georgescu I., Chiu L., Surlin V. Resuscitation principles in severe acute pancreatitis complicated by multiple organ dysfunctions. // *Chirurgia*. 1997; 113; p. 309 – 323.
90. Putney J.W., Steinckwich-Besançon N., Numaga-Tomita T., Davis F.M., Desai P.N., D'Agostin D.M., Wu S, Bird G.S. The functions of store-operated calcium channels. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2016; 1864(6); p. 900 – 906.
91. Renal Disaster Relief Task Force (RDRTF) // International Society of Nephrology. 2015. <https://www.theisn.org/programs/renal-disaster-relief-task-force-rdrtf>
92. Robert V., Gurlini P., Tosello V., Nagai T., Miyawaki A., Di Lisa F., Pozzan T. Beat-to-beat oscillations of mitochondrial [Ca<sup>2+</sup>] in cardiac cells. // *EMBO J*. 2001; 20; p. 4998 – 5007.
93. Rubinstein I, Abassi Z, Coleman R, Milman F, Winaver J, Better OS. Involvements of nitric oxide system in experimental muscle crush injury. // *J Clin Invest*. 1998; 101(6): p.1325-1333.
94. Satake K., Ha S.S., Hiura A. Effects of bradykinin receptor antagonist on the release of beta-endorphin and bradykinin and on hemodynamic changes in a canine model of experimental acute pancreatitis. // *Pancreas*. 1996; 19(3); p. 92 – 97.
95. Sauret J.M., Marinides G., Wang G.K. Rhabdomyolysis. // *American Family Physician*. 2002; 65(5); 907 – 912.
96. Savio-Galimberti E., Ponce-Hornos J.E. Effects of caffeine, verapamil, lithium, and KB-R7943 on mechanics and energetics of rat myocardial bigeminies. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2006; 290(2); p. 613 – 623.
97. Scatchard G. The Attraction of Proteins for Small Molecules and Ions. // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1949; 51(4); p. 660 – 672.
98. Schmid M.C., Mrowka S.W., Turchi J., Saunders R., Wilke M., Peters A.J., Ye F.Q., Leopold D.A. Blind sight depends on the lateral geniculate nucleus. // *Nature*. 2010; 466(7304); 373 – 377.
99. Schmid S.W., Uhl W., Steinle A., Rau B., Seiler C., Buchler M.W. Human pancreas-specific protein. A diagnostic and prognostic marker in acute

- pancreatitis and pancreas transplantation. // *Int. J. Pancreatol.* 1996; 19(3); p. 165 – 170.
100. Sever M.S., Erek E., Vanholder R., Koc M., Yavuz M., Aysuna N., Ergin H., Ataman R., Yenicesu M., Canbakan B., Demircan C., Lameire N. Lessons learned from the catastrophic Marmara earthquake: factors influencing the final outcome of renal victims. // *Clin Nephrol.* 2004; 61(6); p. 413 – 421.
  101. Sheikh I., Krum D., Cooley R., Dhala A., Blanck Z., Bhatia A., Nangia V., Akhtar M., Sra J. Pulmonary vein isolation and linear lesions in atrial fibrillation ablation. // *J. Interv. Card. Electrophysiol.* 2006; 17(2); p. 103 – 109.
  102. Sherman S.K., Maxwell J.S., Sue O'Dorisio M., Thomas M. O'Dorisio, and R. Howe J.R. Pancreastatin Predicts Survival in Neuroendocrine Tumors. // *Ann. Surg. Oncol.* 2014; 21(9); p. 2971 – 2980.
  103. Shonberg J., Scammells P.J., Capuano B. Design strategies for bivalent ligands targeting GPCRs. // *ChemMedChem.* 2011; 6(6); 963 – 974.
  104. Song J., Ding H., Fan H.J., Dong W.L., Sun Z.X., Hou S.K. Canine model of crush syndrome established by a digital crush injury device platform. // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015; 8(6); p. 6117 – 6125.
  105. Stutzmann G.E., Mattson M.P., Sibley D.R. Endoplasmic Reticulum  $Ca^{2+}$  Handling in Excitable Cells in Health and Disease. // *Pharmacol Rev.* 2011; 63(3); p. 700 – 727.
  106. Tatemoto K., Efendić S., Mutt V., Makk G., Feistner G.J., Barchas J.D. Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. // *Nature.* 1986; 324(6096); p. 476 – 478.
  107. Teif V.B. Ligand-induced DNA condensation: choosing the model. // *Biophysical Journal.* 2005; 89(4); p. 2574 – 2587.
  108. Teif V.B. & Rippe K. Statistical-mechanical lattice models for protein-DNA binding in chromatin. // *Journal of Physics: Condensed Matter.* 2010; 22(41); p. 414105.
  109. Thrower E.C., Hagar R.E., Ehrlich B.E. Regulation of Ins(1,4,5)P3 receptor isoforms by endogenous modulators. // *Trends Pharmacol. Sci.* 2001; 22; p. 580 – 586.

110. Tsumura T., Murata A., Yamaguchi F., Sugimoto K., Hasegawa E., Hatase O., Nairn A.C., Tokuda M. The expression of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase I in rat retina is regulated by light stimulation. // *Vision Res.* Sep. 1999; 39(19); p. 3165 – 3173.
111. Tu H., Wang Z., Bezprozvanny I. Modulation of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms by calcium: a role of calcium sensor region. // *Biophys. J.* 2005; 88; p. 1056 – 1069.
112. Valdez C., Schroeder E., Amdur R., Pascual J., Sarani B. Serum creatine kinase levels are associated with extremity compartment syndrome. // *J Trauma Acute Care Surg.* 2013; 74(2); p. 441 – 445.
113. Valicherla G.R., Hossain Z, Mahata S.K., Gayen J.R. Pancreastatin is an endogenous peptide that regulates glucose homeostasis. // *Physiological Genomics Published.* 2013, 45(22); p. 1060 – 1071.
114. Vermunt, J.K. Causal log-linear modeling with latent variables and missing data. // Engel U. and Reinecke J. *Analysis of change: advanced techniques in panel data analysis.* 1996; p. 35 – 60.
115. Vermunt, J.K. Log-linear event history analysis: a general approach with missing data, unobserved heterogeneity, and latent variables. // *Tilburg University Press.* 1996.
116. Vermunt, J.K. Log-linear models for event histories. // *Thousand Oakes: Sage Publications.* 1997.
117. Vu-Quoc, L., Configuration integral (statistical mechanics). 2008. [https://web.archive.org/web/20120428193950/http://clesm.mae.ufl.edu/wiki/pub/index.php/Configuration\\_integral\\_%28statistical\\_mechanics%29](https://web.archive.org/web/20120428193950/http://clesm.mae.ufl.edu/wiki/pub/index.php/Configuration_integral_%28statistical_mechanics%29)
118. Walikonis R.S., Poduslo J.F. Activity of cyclic AMP phosphodiesterases and adenylyl cyclase in peripheral nerve after crush and permanent transection injuries. // *J. Biol. Chem.* 1998; 273; p. 9070 – 9077.
119. Wang H., Zhang X., Xue L., Xing J., Jouvin M.H., Putney J.W., Anderson M.P., Trebak M., Kinet J.P. Low-Voltage-Activated CaV3.1 Calcium Channels Shape T Helper Cell Cytokine Profiles. // *Immunity.* 2016; 44(4); p. 782 – 794.

120. Wang L., Rolfe M., Pround C.G. Ca<sup>2+</sup>-independent protein kinase C activity is required for alpha1-adrenergic-receptor-mediated regulation of ribosomal protein S6 kinases in adult cardiomyocytes. // *Biochemical Journal*. 2013; 373(2); p. 603 – 611.
121. Watson, H.C., Kendrew, J.C. The stereochemistry of the protein myoglobin. <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1MBN>
122. Ward J.B., Petersen O.H., Jenkis S.A., Sutton R. Is an elevated concentration of acinar cytosolic free ionised calcium the trigger for acute pancreatitis? // *Lancet*. 1995; 313(8981); p. 1016 – 1019.
123. Waring A.J., Gupta M., Gordon L.M., Fujii G., Walther F.J. Stability of an amphipathic helix-hairpin surfactant peptide in liposomes. // *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1858(12); p. 3113 – 3119.
124. Weber K., Osborn N. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulphate-polyacrilamide gel electrophoresis. // *Gastroenterology*. 1997; 113; p. 286 – 294.
125. Widdison A.L., Cunningham S. Immune function early in acute pancreatitis. // *Br J Surg*. 1996; 83(5); p. 633 – 636.
126. Wienken C.J., Baaske P., Rothbauer U., Braun D., Duhr S. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. // *Nature Communications*. 2010; 1:100. doi: 10.1038/ncomms1093.
127. Willems P.H. G.M., Vanemstdevries S.E., Depont J.J. Dose-dependent recruitment of pancreatic acinar cells during receptor-mediated calcium. // *Cell calcium*; 1993; 14(2); p. 145 – 160.
128. Wu J., Li N., Liu Y., Li W., He A., Zhu D., Feng X., Liu B., Shi R., Zhang Y., Lv J., Xu Z. Maternal high salt diet altered Adenosine-mediated vasodilatation via PKA/BKchannel pathway in offspring rats. // *Mol. Nutr. & Food. Res*. 2017. doi:10.1002/mnfr.201600963
129. Wu R., Jurek M., Sundarababu S., Weinstein D.E. The POU gene Brn-5 is induced by neuregulin and is restricted to myelinating Schwann cells. // *Mol Cell Neurosci*. 2001; 17(4); p. 683 – 695.

130. Yule D.I., Betzenhauser M.J., Joseph S.K. Linking structure to function: recent lessons from inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mutagenesis. // *Cell Calcium*. 2010; 47; p. 469 – 479.
131. Zakharov S.D., Li X., Red'ko T.P., Dilley R.A. Calcium binding to the subunit c of *E. coli* ATP-synthase and possible functional implications in energy coupling. // *J Bioenerg Biomembr*. 1996; 28(6); p. 483 – 494.
132. Zavalkoff S., Crush syndrome // *Trauma Rounds*. 2009, Montreal-Children's Hospital.
133. Zhang H., Sun S., Herreman A., De Strooper B., Bezprozvanny I. Role of presenilins in neuronal calcium homeostasis. // *J. Neurosci*. 2010; 30; p. 8566 – 8580.
134. Zhou W., Shen F., Miller J.E., Han Q., Olson M.S. Evidence for altered cellular calcium in the pathogenetic mechanism of acute pancreatitis in rats. // *J. Surg. Res*. 1996; 313(1); p. 147 – 155.