

**ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ**

ՄԻՔԱՅԵԼՅԱՆ ՀԱՅԿ ՄԻԿԱՅԻԼԻ

**ԿԱՐԴԻՈՄԻՈՑԻՏՆԵՐՈՒ Մ ՈԱԴԻՈԼ ԻԳԱՆԴԻ ԽՆԱՄԱԿՑՈՒԹՅԱՆ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՄԱՆ ՀԱՄԱԿԱՐԳԶԱՅԻՆ ԿՐԱԳԻՐ՝ ԸՍՏ ՍԿԵՏՉԱՐԴԻ
ԿՈՈՐԴԻՆԱՏՆԵՐԻ**

Գ. 00. 04 – Կենսաքիմիա

**մասնագիտություն ամբ կենսաբանական գիտություն ու ներքի թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայ ցման ատենախոսություն**

Ս Ե Ղ Մ Ա Գ Ի Ր

ԵՐԵՎԱՆ – 2017

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ**

МИКАЕЛЯН АЙК МИХАЙЛОВИЧ

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

03. 00. 04 – Биохимия

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

ЕРЕВАН - 2017

Ատենախոսություն ան թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բոլնիսյանի
անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտի գիտական խորհրդում:

Գիտական ղեկավար՝
Գ.Ա.Գևորգյան

Կենսագիտություն, պրոֆ.

Պաշտպանության ընդդիմախոսներ՝

Կենսագիտություն, պրոֆ.

Մ.Ա.Սիմոնյան
Կենսագիտություն Գ.Վ.
Գյուլխանյան

Առաջատար կազմակերպություն՝
ԲԺՀ կական

Մ. Յերացու անվան պետական
համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2017թ. հունիսի 30-ին, ժամը 15:00-ին ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում, Կենսաքիմիայի 042 մասնագիտական խորհրդում (ՀՀ, 0014, Երևան, Յասրաբյան 7):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գրադարանում և <http://molbiol.sci.am> կայքում:

Սեղմագիրն առաքվել է 2017թ. մայիսի 29-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,

Կենսագիտություն



Գ.Մ.Սկրտչյան

Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета Института биохимии им. Г. Бунятына НАН РА.

Научный руководитель:

доктор биол. наук, проф. Геворкян Г.А.

Официальные оппоненты:

доктор биол.наук, проф. Симонян М.А.
канд. биол. наук Гюлханданян Г.В.

Ведущая организация:

Ереванский государственный университет им. М. Гераци

Защита диссертации состоится 30 июня 2017г. в 15:00 часов на заседании специализированного совета 042 по Биохимии, в Институте молекулярной биологии НАН РА (РА, 0014, г. Ереван, ул. Асратяна 7).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии НАН РА и на сайте <http://molbiol.sci.am>.

Автореферат разослан 29 мая 2017г.

Ученый секретарь специализированного совета 042,

канд. биол. наук



Մկրտչյան Գ.Մ.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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, вызывающие некротическое повреждение. Рассматриваются острый панкреатит (ОП) и «синдром длительного раздавливания» (СДР) вызывающие инфаркт миокарда. Как при ОП, так и при СДР, миокард повреждается под воздействием «миокард депрессирующего фактора» - октапептид – в первом случае, и нонапептид – 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-концой аминокислотой – аргинином (Guevorgyan A.G. et al., 2016).

Точное понимание метаболизма кардиомиоцитов позволяет изысканию новых путей целенаправленного воздействия на нарушенные звенья. Актуальным считается изучение действия природных биологически активных соединений в вопросе регуляции нарушенных звеньев метаболизма миокарда на вышеуказанных экспериментальных моделях. Информативным является изучение транслокации ионов Са, афинность этих ионов к мембранным белкам саркоплазматического ретикулума (СР) и митохондрий (М) кардиомиоцитов. 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).

Анализ систем с неспецифическим связыванием проводят, как правило, в координатах Скэтчарда, где поставляя значения в график легко прийти к аналитическому виду зависимости концентрации неспецифического лиганда от величины специфического связывания. Рассматриваются 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 замещаемой избытком немеченого лиганда, часто неточны, что приводит либо к завышению числа высокоаффинных рецепторов и недооценке сродство данного лиганда к его рецептору, или в криволинейной Скэтчарда предполагая наличие отрицательной кооперативности или нескольких классов сайтов связывания. 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 реально делает возможность такого снижения согласно требуемой чувствительности и соотношения констант скоростей образования специфического и неспецифического комплексов (Scatchard G., 1949; В кн: «Аналитическая химия. Проблемы и подходы», М., 2004). Разрешению вышеизложенной проблемы разработана программа расчета величин афинности 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-Bioelectronic, France).

На экспериментальных моделях повреждения миокарда, как панкреонекроз и некротическое повреждение при СДР изучали количественные и качественные сдвиги ионов Са в кардиомиоцитах, афинность ионов Са к мембранным белкам СР и М. Зарегистрированные нарушения метаболизма кардиомиоцитов коорректировали природным цитокином «пролин богатым пептидом», открытый акад. А. Галояном (Galoyan A.A., 2002; Galoyan A.A., 2004).

Цель и задачи исследования Разработка компьютерной программы для обработки результатов специфического связывания в координатах Скетчарда, изучить сродство мембранных белков СР и М к ионам кальция при экспериментальных патологиях миокарда с использованием метода сцинтилляционной спектрометрии. Изучить биологическое воздействие ПБП на метаболизм и морфологию поврежденного миокарда.

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.
2. Компьютерная программа должна быть разработана на основе диалогового компьютерного языка LEM-II которым снабжены процессоры сцинтилляционных спектрометров серии SL, фирмы Roche-Bioelktronique Kontron, France.
3. Используя радиолиганд – $^{45}\text{CaCl}_2$, в условиях *in vivo*, изучить сродство ионов кальция к мембранным белкам СР и М кардиомиоцитов, выявить кальций связывающие белки и рассмотреть изменения их сродства при некротическом повреждении миокарда.
4. Рассчитать соотношение концентраций радиолиганда и немеченого лиганда для построения графиков Скетчарда с коэффициентом корреляции 90%.
5. Воссоздать картину инфаркта миокарда на экспериментальных моделях острого панкреатита (ОП) и «синдрома длительного раздавливания» (СДР).
6. 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, что как при ОП, так и при СДР меняется сродство мембранных белков СР и М к ионам кальция. Эти изменения идентичны по своей картине при ОП и СДР. Особенное интересным является факт резкого изменения транслокация ионов Ca^{++} и их афинность в СР. Изменения распределения Ca^{++} компенсируется проявлением нового Ca^{++} - связывающего свойства у мембранного белка с о.м.м. 32 кДа, который у интактных животных не обладал подобными характеристиками. Для получения статистически достоверных результатов об уровне сродства мембранных белков к ионам кальция, применяется метод Скетчарда. Впервые 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 кальций приобретает за счет включения в аминокислотный состава дикарбоновых аминокислот, что делает возможным связывание двухвалентного кальция карбоксильными группами аминокислоты. Свидетельством этого является снижением кислотности данного белка с рН 8,3 до рН 6,8. Уровень сродства возрастает параллельно со снижением афинности у классических мембранных белков СР, по всей вероятности играя компенсаторную роль в сохранении целостности СР и миокарда в целом. 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 афинности ионов кальция со спектром у интактных животных.

Практическая значимость работы. Изучение нарушения метаболизма миокарда и степень его повреждения при СДР и ОП делает возможным распознаванию возможных нарушений, изысканию путей восстановления и регулирования метаболизма, а также возможной экстраполяции полученных результатов в практику. Воссозданные нами экспериментальные модели ОП и СДР дают полную картину развития двух патологий, что делает возможным в эксперименте можно изучить развитие нарушений на разных этапах патогенеза и изыскать пути целенаправленного воздействия на нарушенные звенья.

Материалы экспериментальных результатов можно включить в курс общей и клинической биохимии в ВУЗ-ах и специальных учебных медицинских центрах.

Апробация работы. Основные результаты настоящей работы были представлены и обсуждены на семинаре в Nyenrode Business Universiteit, Breukelen, Netherlands, 2017, на семинарах и заседаниях ученого совета Института биохимии НАН РА (2014 - 2017).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 3 печатные работы.

Объем 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, описании материала и методов исследования, изложения полученных экспериментальных результатов, заключения, выводов и списка использованной литературы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты ставили 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 повреждения миокарда и инфаркт вызывает октапептид продуцируемый ишемизированным панкреасом в кровь и названный «миокард депрессирующий фактор».

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, образовавшийся 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 бета-амилоидный пептид, который проникает через гемато-энцефалический барьер, попадает в мозг и вызывает его нейродегенеративное повреждение.

Продуктами распада миоглобина зафиксированные 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 остатков

Свойство «миокард депрессирующего фактора» проявляет пептид состоящий из 9 аминокислотных остатков.

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 (30.000 g / 35 мин) 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 фенолметилсульфонил 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 / 15 минут (Hoppel C. & Cooper C., 1969). Осадок дважды промывали 0.5%-ным раствором дигитонина и немедленно осаждали при 105.000 g / 30 минут.

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).

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 M мочевины. Для предотвращения расплзания 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 (Laemmlí 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 Мг фирмы «Sigma» США. Величину сродства ионов кальция к мембранным белкам СР и М определяли на газопроточном счетчике Ваerthold II.

Определение величины максимального связывания кальция (V_{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 мМ количество холодного Ca^{2+} , обеспечивающее неспецифический захват Ca^{2+} . Затем, по нулевой точке, а также по значениям стандартных проб №№ 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_{max} и K_d для каждой серии проб, состоящих из трех повторностей. При величине коэффициента корреляции кривой менее 90% данные автоматически не считываются из-за низкой достоверности результатов.

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 Laemmlí U.K. (1970). Достоверность полученных результатов составляет $\delta_t = 92\%$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сцинтилляционные спектрометры серии CG и SL-4200 (Roche Bioelektronique Kontron, France) снабжены микропроцессором обеспечивающий работу спектрометра, 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 аналогичны тем, которые используются в повседневной арифметики, в математических функциях и на человеческом языке. Специальные функции символизированы легкими для запоминания сокращениями. 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, как только в система была введена в "Execution mode". Порядковый номер строки или "метка" позволяет системе выполнять программу в желаемом порядке. Обычно программа изначально написана так, чтобы две последовательные метки имели разницу 5 или 10. Таким образом, дополнительные инструкции могут быть вставлены между двумя строками, которые уже существуют и если в этом возникнет необходимость. Таким образом, это не является обязательным условием, чтобы переписать программу для освобождения место 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 гибкую 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 управления принтера. По 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 внесенный в спектрометр для дальнейших расчетов.

Так, расчет 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 изложен пример простой программы.

Строка	Метка	Инструкция
		10DEX
		20DST
		30A=CA/TM,B=CB/TM
		40W_№,TM,A,B,EX/
		50AVN
		60G_10

В данном руководстве \emptyset 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 №, 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 строку.

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 средства, что 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 М 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 введена 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.

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, что 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.

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.

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 М 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 когда 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.

Быстрый считыватель перфоленты

Быстрый считыватель используется совместно как Background так и в режиме Foreground. Инструкция R_2, выполненная обоими режимами, приведет к считыванию информации с магнитной ленты, которые будут введены в регистры, назначенные как соответствующие инструкции Background и Foreground режимов.

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 режима 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.

ДИАЛоговая ПРОГРАММА СКЕТЧАРДА ДЛЯ РАСЧЕТА СПЕЦИФИЧЕСКОГО СВЯЗЫВАНИЯ

Используя радиоактивный $^{45}\text{CaCl}_2$ проводили изучение связывание радиолганда с мембранными белками саркоплазматического ретикулума (CP) и белками внутренних мембран митохондрий (M) миокарда в норме и после некротического повреждения. Экспериментальными моделями повреждения миокарда были отобраны модель острого панкреатита (OP) 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 явилось изучение сродства (аффинность) кальция к мембранным белкам CP и M 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, считаваемые образцы, содержащие ^{45}Ca , который имеет бета/минус/распад, дают значения импульс/мин, т.е. относительная 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 регистрируются с разной эффективностью. Радиоактивный ^{45}Ca регистрируется с эффективностью 92-95%. Следовательно, для получения значения абсолютной радиоактивности необходимо разделить имп/мин на эффективность счета, который рассчитывается методом «внешней стандартизации» благодаря заложенным 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 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.

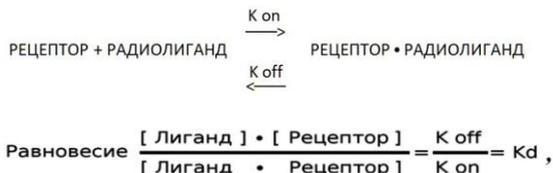
Радиолигандом является радиоактивно меченный препарат, который можно связать с рецептором, транспортером, ферментами или другими биологическими структурами. Измерение скорости и степени связывания предоставляет информацию о количестве сайтов связывания, их близость и доступность для различных препаратов.

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



где

K_{off} — константа скорости диссоциации ,

K_{on} — константа скорости ассоциации ,

K_d — 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 считает самой высокой. Если в исследуемых образцах из триплета выпадает и выбраковывается один образец, то это значение не учитывается, и данный результат рассчитывается по двум образцам.

По нулевой, третьей и шестой концентрациях неспецифического связывания (NSB-nonspecific bound) строится кривая неспецифического связывания и рассчитывается 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 (CP) 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 связывании 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 СР и М и получение «вывернутых» органелл, позволяет открыть доступ радиолиганда к рецепторам СР 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.

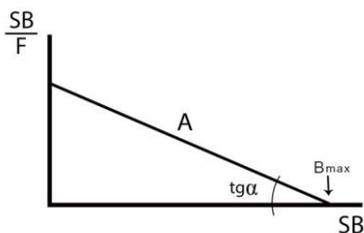


Рисунок. 1. Рабочая кривая Скетчарда, по которой считываются специфическое связывание и коэффициент корреляции.

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. 1). Эти две величины, BM и Kd , 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 ($\text{nM ligand} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$) в точках с низким сродством (low affinity) и в центре с высоким сродством (high affinity), величина константы диссоциации лиганд - рецепторного комплекса – Kd ($\text{nmol ligand} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$). Константа диссоциации – Kd , 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 гидрофобность 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 радиолганда в присутствии насыщенной концентрации немеченого лиганда, который связывается с рецепторами. В этих условиях, практически все рецепторы заняты наменным препаратом и радиолганда может связываться только с неспецифическими сайтами. Необходимо произвести вычитание неспецифического связывания в определенной концентрации радиолганда от общего связывания в этой концентрации, чтобы рассчитать специфическую связывания радиолганда с рецепторами.

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

Какой концентрации немеченого лиганда следует использовать? Необходимо использовать достаточное количество, чтобы блокировать связывание практически все специфические сайты радиолганда, 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, превышающая в 100 раз выше концентрации 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 Скetchарда составлена для работы с радиолгандами 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	<i>Втах, нмоль кальция x мг⁻¹ белка</i>		<i>Kd, нМ кальция x мг⁻¹ белка</i>	
	<i>Центр с низким средством</i>	<i>Центр с высоким средством</i>	<i>Центр с низким средством</i>	<i>Центр с высоким средством</i>

В сцинтилляционном спектрометре SL-4221 рабочая программа функционирования спектрометра состоит из следующих блоков: В Main – 3397, В Loma – 127, В Solv – 359, В Prog 464

Диссертантом составленная программа специфического связывания лиганда с рецептором состоит из следующих блоков:

Блок В ТАРЕ

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=H2
 2+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=SQRM32
 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+M2
 1,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=SQRM28
 505 M29=M25-M40/D,M29=SQRM29

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+M
 43,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 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

Табл. 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> _{max} , нмоль кальция х мг ⁻¹ белка		<i>K</i> _d , нМ кальция х мг ⁻¹ 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

Анализ полученных результатов показал, что как и во всех определениях Скетчарда, максимальное количество связавшегося лиганда – *V*_{max}, имеет две точки связывания ⁴⁵Ca⁺⁺ – 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 Са²⁺. Сродство кальсеквестрина, обладающего наиболее выраженным сродством к ионам кальция, способен связывать до 43 молей Са²⁺ на моль белка. Имеет две изоформы - CASQ1- в скелетных мышцах и CASQ2 – в сердечной мышце.

Табл. 2.

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

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

Коэффициент корреляции - $R = 90\%$, Достоверность - $\sigma t = 92\%$ 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 ≥ 10 -5 М. В конечном итоге выброс ионов Ca^{2+} является пусковым механизмом процесса сокращения миофибрилл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью настоящей диссертационной работы явилось изучение средства 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. Для достижения поставленной задачи , в рамках настоящей диссертационной работы была проведена разработка программы компьютерной обработки полученных результатов по средству 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.

Используя радиолиганд – $^{45}CaCl_2$, в условиях *in vivo* и *in vitro* были изучены средство ионов кальция к мембранным белкам СР и М кардиомиоцитов, выявлены кальций связывающие

белки и изучены изменения их сродства при некротическом повреждении миокарда, в частности, при остром панкреатите и «синдроме длительного раздавливания».

Была разработана программа машинного расчета координат графика Скетчарда с коэффициентом корреляции 90% для расчета соотношений концентраций радиолиганда и немеченого лиганда на модельных крысах с повреждением миокарда, для достижения которых были воссозданы картины инфаркта миокарда на экспериментальных моделях острого панкреатита (ОП) и «синдрома длительного раздавливания» (СДР).

ВЫВОДЫ

1. Разработка компьютерной программы для подсчета сродства радиолиганда к рецепторам 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 биоптант больного онкологией и применяя программу экспресс определения специфического связывания можно определить минимальную дозу препаратов химиотерапии, тем самым снижая их токсичность.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Микаелян А.М. Нарушения сродства мембранных белков саркоплазматического ретикулула с ионами кальция при синдроме длительного раздавливания у белых крыс. // Мед. наука Армении. 2017; 57(1):80-88.
2. Микаелян А.М., Геворкян А.Г., Геворкян Г.А. Разработка компьютерной программы для изучения связывания радиолиганда в биологических структурах по методу Скетчарда. // Мед. наука Армении. 2016; 56(4):64-69.
3. Guevorkyan A.G., Alchujyan N.Kh., Mikayelyan H.M., Barseghyan V.H., Hayrapetyan H.L., Khachatryan H.F., Grigoryan V.S., Melkonyan L.H., Chailyan S.G., Kevorkian G.A.. Beneficial effects of hypothalamic proline-rich peptide-1 on the heart failure associated with experimental pancreatic necrosis and crush syndrome. // European Chemical Bulletin. 2016; 5(6):259-265.

ՄԻՔԱՅԵԼՅԱՆ ՀԱՅԿ ՄԻՒՅԻՆԻ

ԿԱՐԴԻՈՒՌՈՑԻՏՆԵՐՈՒ Մ ՈԱԴԻՈԼ ԻԳԱՆԴԻ ԽՆԱՄԱԿՑՈՒ ՌՅԱՆ ՈՒ ՍՈՒ ՄԼԱՄԻՐՄԱՆ ՀԱՄԱԿԱՐԳՉՈՒՄՆԻՆ ԾՐԱԳԻՐ՝ CUS ՍԿԵՏՉԱՐԴԻ ԿՈՈՐԴԻՆԱՏՆԵՐԻ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Առանցքային բառեր` Ռադիոլիզանոդ, Սկետչարդի մեթոդի համակարգչային ծրագիր, երկարատև ճզմման համախտանիշ, սուր պանկրեատիտ, կալցիոլ միսամակցող պրոտեին

CG և SL-4200 շարքի սցինտիլյացիոն սպեկտրոմետրերը (Roche Bioelektronique Kontron, France) հագեցած են սպեկտրոմետրի աշխատանքն, ինչպես նաև արդյունքերի համակարգչային մշակումն ապահովող միկրոպրոցեսորով: Նման միկրոպրոցեսորի հաղորդակցվելու լեզունն LEM-II-ն է: Լինելով համակարգչային հաղորդակցության լեզուն` LEM-II-ն օգտագործում է ամենօրյա թվաբանության մեջ, մաթեմատիկական ֆունկցիաներում և մարդկային լեզվում կիրառվող համանման նշանները: Հատուկ գործառնությունները ներկայացված են հեշտ մտաբերվող հասարակումների տեսքով: Ծրագրի տրամաբանությանը կարգ է հասկանալի: Ծրագիրը ձայնագրվում և պահվում է հիշողության մեջ ստեղնաշարի վրա "Program mode" հրահանգի միջոցով: Յուրաքանչյուր տողի մեջ պարունակվում է մեկ կամ մի քանի հրահանգ: Համակարգում "Execution mode" ռեժիմի ներդրման պահից բոլոր տողերը նշվում են և գործարկվում են իրենց վրա արված նշումների թվային կարգի համաձայն: Տողի հաջորդական համարը կամ «նշումը» թույլ է տալիս համակարգին գործարկել ծրագիրը նախընտրած հաջորդականությամբ: Ծրագիրն ի սկզբանե գրված է այնպես, որ երկու հաջորդական նշումներն ունենան 5 կամ 10 տողերի տարբերություն: Այսպիսով, կրացուցիչ հրահանգները կարող են տեղակայվել արդեն առկա երկու տողերի միջև, նաև անհրաժեշտության դեպքում: Ուստի, ծրագիրը վերաշարադրելու նոր տողերի համար, որոնց անհրաժեշտությունն ի սկզբանե կանխատեսելի էր, տարածությունն ազատելու հարկ չկա: Սկետչարդի մեթոդը նախատեսված է ռադիոլիզանոդի սպեցիֆիկ խնամակցության ուղղումը համար: Դրա համար անհրաժեշտ է ընտրել միայն 6 խտություններում ռադիոակտիվ լիզանոդ պարունակող 6 եռյակ, որպեսզի կառուցվի ստուգված տման կոր: Այնուհետև պետք է պատրաստել 8 եռյակ-նմուշ, որտեղ առաջին երկուսը պարունակում են ոչ ռադիոակտիվ, «սառը» լիզանոդ, ինչպես նաև միջավայր և հետազոտվող կենսաբանական նմուշը, այս դեպքում` «շրջված» սարկոպլաստիկ ռեպրոդուկում կամ միտոքոնդրիոմի ներքին մեմբրաններ: ՍՌ-ի և Մ-ի հատուկ մշակումը և «շրջված» օրգանելների ստացումը թույլ է տալիս ռադիոլիզանոդի համար բացել մոտավոր դեպի ՍՌ ընկալիչներ պոլիզանոդի, մերդեպքում` ⁴⁵CaCl₂ նկատմամբ: Հետազոտվող նմուշում «սառը» և ռադիոակտիվ լիզանոդի առկայությունը որոշում է ոչ սպեցիֆիկ խնամակցությունը, որը համապատասխանում է ստուգված տման կորի (խտություն) 3-րդ և 6-րդ կետերին: Մնացած 6 եռյակը, յուրաքանչյուր կետում մեկ եռյակ, տալիս են սպեցիֆիկ և ոչ սպեցիֆիկ խնամակցության վերջնական արդյունքը:

Ճրագիրը նախագծված է 10% տարբերությունը ն տվող արդյունքների խտանման սկզբունքով, որից հետո շարունակում են հաշվել դուալ ետի միջին արժեքը, իսկ հետագա հաշվարկներն արվում են դուալ եքսների միջին արժեքներից: 0, 3 և 6 խտությունների հիման վրա կառուցվում է ոչ սպեցիֆիկ արժեքի կորը և հաշվարկվում է կորի հարաբերակցության գործակիցը: Եթե այդ արժեքը կազմում է 92%-ից պակաս, ապա մեքենան արտածում է հնարավոր սխալի մասին «!!!!» նախագուշացումը: Այնուհետև շարունակվում է ոչ սպեցիֆիկ խնամակցության արժեքի հաշվարկը: Մնացյալ 6 եռյակից դուրս են բերվում ոչ սպեցիֆիկ խնամակցության արժեքները: Շարունակելով հաշվարկները՝ մեքենան ավտոմատ կերպով հաշվում է $F=G-SB$, որտեղ G -ն առաջին վեցի խտությունների աստիճանավորման արժեքն է, իսկ SB -ն՝ սպեցիֆիկ խնամակցության արժեքներն են: Այս հաշվում է SB/F և արտածվում են արժեքների 6 գույգ (սպեցիֆիկ խնամակցություն) և SB/F , որտեղ F -ն չխնամակցված լիզանդի խտությունն է:

Այնուհետև կառուցվում է ուղիղ (կամ ուղիղ կոտրվածքով, եթե խնամակցության կետերը մեկից ավելի են), և t ցանկյան թեքությամբ հաշվարկվում է սպեցիֆիկ խնամակցությունը՝ A հատման կետում (BM ոչ սպեցիֆիկ խնամակցություն) և Kd դիսոցացման հաստատունը: BM և Kd -ն համարվում են գիտափորձի համար փնտրվող մեծություններ: Ինչից հետո հերթականությամբ բացառվում են 6 կետերից յուրաքանչյուրը և կրկին հաշվում են տվյալները, սակայն արդեն մեկ կետի բացակայությամբ: Այսպիսով, 5 կետերով հաշվարկվում է հարաբերակցության գործակիցը: Եթե հարաբերակցության գործակցի արժեքը 92%-ից պակաս է, ապա գիտափորձի արդյունքները համարվում են երկու կետով նույնատիպ հարաբերակցություն: Իսկ եթե գիտափորձի արդյունքները չեն համապատասխանում 92% հարաբերակցությանը, ապա այն համարվում է վիճակագրորեն ոչ ճշգրիտ:

Ստացված արդյունքերը թղթարկվում են աղյուսակի տեսքով, որտեղ նշված են՝ B_{max} խնամակցված լիզանդի մեծությունը (նմուշ լիզանդ x մգ⁻¹ սպիտակուց) ցածր և բարձր խնամակցության կետերում, լիզանդի դիսոցիացիայի հաստատուն մեծությունը, ընկալիչների Kd (նմուշ լիզանդ x մգ⁻¹ սպիտակուց) համալիրը: Kd դիսոցիացիայի հաստատունը ցույց է տալիս այն ռադիոլիզանդի քանակային մեծությունը, որը համալիրի ձևավորման և դիսոցիացիայի ընթացքում մնում է միշտուկայուն խնամակցված:

Ռադիոլիզանդի խնամակցությունն ընկալիչի հետ կարող է լինել ինչպես սպեցիֆիկ, այնպես էլ՝ ոչ սպեցիֆիկ: Ոչ սպեցիֆիկ խնամակցությունը կարող է ներկայացնել մի շարք երևույթներ: Այսպես, շատ դեպքերում ոչ սպեցիֆիկ խնամակցության հիմնական մասը իրենից ներկայացնում է մեմբրանների հետ լիզանդի փոխադրեցությունը: Մոլեկուլային մեխանիզմները հայտնի չեն, սակայն ոչ սպեցիֆիկ խնամակցությունը կախված է լիզանդի լիցքից և հիդրոֆոբությունից: Երկրորդ, ոչ սպեցիֆիկ խնամակցությունը կարող է լինել ընկալիչների, կրիչների և այլ սպիտակուցների հետ խնամակցության տեսակ, որոնք հետագոտողի մոտ հետաքրքրությունն չեն առաջացնում և որոնք կարելի է համարել ոչ սպեցիֆիկ: Ոչ սպեցիֆիկ խնամակցությունը բացահայտվում է ռադիոլիզանդի խնամակցությունը չափելու եղանակով՝ չնշված լիզանդի հագեցած խտության առկայության դեպքում, որը խնամակցվում է

ընկալիչների հետ: Այս պայմաններում գրեթե բոլոր ընկալիչները գբաղված են չնշված պրեպարատով, ուստի ռադիոլիգանդը կարող է խնամակցվել ոչ սպեցիֆիկ կետերի հետ: Անհրաժեշտ է կատարել ռադիոլիգանդի որոշակի խոռոչյան մեջ ոչ սպեցիֆիկ խնամակցության հանումը ընդհանուր խնամակցության խոռոչում նից՝ ընկալիչների հետ ռադիոլիգանդի սպեցիֆիկ խնամակցությունը հաշվարկելու համար:

Ընկալիչի հետ լիգանդի սպեցիֆիկ և ոչ սպեցիֆիկ խնամակցության արդյունքների, նաև, լիգանդ-ընկալիչ համալիրի հաստատուն դիսոցիացիան սահմանող մեթենայական մշակում իրականացնող ծրագրի ստեղծումը դեղամիջոցների ազդեցության գործընթացների, նոր պրեպարատների հատկությունների, տարբեր էթիոլոգիաների պայթնիոգիաների զարգացման փորձարարական ուսունասիրության, ինչպես նաև առավել արդյունավետ բուժման մեթոդների ընտրության և այն հնարավորությունն է ընձեռնում:

HAYK MIKHAYIL MIKAYELYAN

A COMPUTER PROGRAM FOR STUDYING THE BINDING OF RADIOLIGANDS IN CARDIOMYOCYTES ACCORDING TO THE SCATCHARD COORDINATES

SUMMARY

Key words – Radioligand, Scatchard plot computer program, acute pancreatitis, crush syndrome, calcium-binding protein

The scintillation spectrometers of the CG and SL-4200 series (Roche Bioelektronique Kontron, France) are equipped with a microprocessor, which provides work of spectrometry, as well as, for computer processing of the results. The dialogue language of such a microprocessor is LEM II. Being a dialogue computer language, LEM-II uses similar to everyday arithmetic, mathematical functions and human language symbols. Special functions are represented in the form of easy to remember abbreviations. The logic of the program is simple and understandable. The program is recorded and stored in memory through the keyboard in the "Program mode" mode. Each line contains one or more commands. All lines are marked and performed in numerical order of their markings, since the "Execution mode" has been entered into the system. Serial number of line or "marking" allows system to perform the program in preferable order. Initially, the program had been written so that two following marks have difference of 5 or 10 lines. Thus, additional instructions can be put in between two lines, which already exist, if it is necessary. So, this is not mandatory condition to rewrite the program in order to free up places for new lines the necessity of which was not obvious initially.

Scatchard's method consists in determining specific binding of the radioligand, for which are selected 6 triplets, containing only radioactive ligand at 6 concentrations for getting a calibration curve. After that, 8 triplet samples are prepared, where first two samples contain a non-radioactive - a "cold" ligand, an incubation environment, a radioactive ligand and biological specimen for study, in this case an "inside-out" sarcoplasmic reticulum or internal membranes of mitochondria. The special processing of CP and M and getting of "inside-out" organelles allows to open the access of the radio ligand to the receptors of CP with the respect to that ligand, in our case, to $^{45}\text{CaCl}_2$. The presence of a "cold" and a radioactive ligand in the specimen under study determines the non-specific binding, appropriate to the 3 and 6 points on the calibration (by concentration) curve.

The remaining 6 triplets, separately one triplet on each point, give a total result on specific and non-specific binding. The program is created on the principle of rejection of results, which are different

on 10%, after which continue to calculate from average value of doublet, and further calculations are hold from average value of duplexes. Based on 0, 3 and 6 concentrations is built a curve of non-specific value and calculated coefficient of the correlation of the curve. If that value is less than 92%, then the machine start to output «!!!!!» as a warning of a possible error. Then it continued to calculate the value of non-specific binding. From the remaining 6 triplets are calculated values of non-specific binding. Continuing the calculations, machine automatically calculates $F = G - SB$, where G is calibration values of first six concentrations, and SB is for values of specific binding. After that is calculated SB/F and output 6 pairs of values for SB (specific binding) and SB/F, where F is for concentration of unbound ligand.

Then it is necessary to build a plot (or broken curve, when binding points are more than one) and by slope of angle $\text{tg}\alpha$ calculated specific binding - the point of intersection of A (BM – specific binding) and Kd - the dissociation constant. These two quantities, BM and Kd, are required for this experiment. After that, each of six points is alternately eliminated and date is calculated again, with the exception of one point. Hence, correlation coefficient is calculated for 5 points. If the value of the correlation coefficient is less than 92%, then the results of the experiment are considered at two points of the same concentration. If the results of the experiment do not correspond to 92% of the correlation, then the experiment is considered statistically unreliable.

Received results are given in the form of a table, in which indicated Bmax – quantity of the bound ligand (nmol ligand x mg^{-1} protein) at the points with low affinity and at the centers with high affinity, the quantity of constant of dissociation ligands - receptor complex – Kd (nM ligand x mg^{-1} protein). The constant of dissociation – Kd, indicates to that quantity of amount of radioligand, which in the process of formation and dissociation of the complex always remains stably bound. The binding of the radio ligand to the receptor can be either specific or non-specific. Non-specific binding might represent some phenomena. Thus, in most cases, majority of non-specific binding is the interaction of ligand with membranes. Molecular details are not clear, but non-specific binding depends on charge and hydrophobicity of the ligand. Secondly, non-specific binding may be also bound to the receptors, transport and other proteins, which researchers are not interested in, which can be considered as non-specific.

Non-specific binding is detected by measuring the binding radioligand in the presence of a saturated concentration of unmarked ligand that binds to the receptors. Under these conditions, nearly all receptors are occupied with the specified biological medical product, and radioligand can only bind to non-specific sites. It is required to perform subtraction of non-specific binding at a certain concentration of the radioligand from the entire binding at this concentration in order to calculate the specific binding of the radioligand to the receptors.

The development and creation of a computer program for processing the results of the specific and non-specific binding of the ligand to the receptor, also the determination of the dissociation constant of the ligand-receptor complex, delivers an opportunity for a wide-ranging study of the processes of medical products effects, study of the properties of new medical products, experimental studies of the development of pathologies of various etiologies, also the choice of more effective methods of treatment.

The developed program also allows creation of a histogram based on the results of the experiment.

