

На правах рукописи

КУЗЬМИЧЕВА
Валерия Игоревна

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ЛАКТАТА
В РЕГУЛЯЦИИ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ**

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Краснодар – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук, профессор
Гильмиярова Фрида Насыровна.

Официальные оппоненты:

Мустафин Ильшат Ганиевич, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра биохимии и клинической лабораторной диагностики, заведующий кафедрой;

Бородулин Владимир Борисович, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра биохимии химии, заведующий кафедрой.

Ведущая организация: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится 19 мая 2020 г. в 10.00 на заседании диссертационного совета Д 208.038.02 на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России) (350063, Краснодар, ул. Митрофана Седина, 4, тел. (861)2625018).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и официальном сайте (<http://www.ksma.ru>) ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 208.038.02
доктор медицинский наук,
доцент



Лапина Наталья Викторовна

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Расшифровка структурных, молекулярных и клеточных путей и сигналов, лежащих в основе заболеваний, а также разработка и внедрение инструментов диагностики и лечения представляется актуальной задачей. Особое значение имеют вопросы молекулярного окружения и лигандного взаимодействия в норме и при развитии патологических состояний, что оказывает влияние на формирование диагностических и терапевтических подходов [E.S. Kim, 2015; M.Brunori, S.Gianni, 2016; M. Bluth, 2018].

Вместе с тем, малые молекулы – органические соединения, обладающие молекулярной массой от 40 до 1000 Да [P.Fechner et al., 2014] – являются интермедиатами многих биохимических реакций, появляются данные об их способности влиять на процессы передачи сигнала, вызывать посттрансляционные модификации, изменять скорость синтеза белка, влиять на активность клеточных процессов [A.R. Cantelmo et al., 2015]. Взаимодействия метаболит-белок контролируют различные клеточные процессы, играя тем самым важную роль в поддержании гомеостаза. Метаболиты составляют самую большую часть молекул в клетках, но наши знания о взаимодействии метаболита и белка отстают от понимания взаимодействий типа белок-белок [L.Jin et al., 2014; B.P.Cossins, A.D. Lawson, 2015; I.Piazza et al., 2018; X. Liang et al., 2019]. Раскрытие сути этих межмолекулярных отношений поможет в объяснении функциональных и структурных принципов химической коммуникации, количественной характеристики параметров связывания метаболитов в масштабе белка.

Понимание взаимодействия между малыми молекулами и белками может рассматриваться с различных точек зрения и имеет важное значение для развития фундаментальной науки и разработки лекарственных средств. В настоящее время существуют два основных подхода к изучению данного вопроса: метаболитцентрический – в основу которого положено определение биологических и терапевтических эффектов метаболита путем применения их как зондов при взаимодействии с различными белковыми мишенями [A. McFredries et al., 2013] и протеинцентрический, где опорной точкой служит конкретный белок, для которого методами *in silico* определяют эндогенные метаболиты, способные связываться с ним [A.P. Frei et al., 2012]. Интеграция этих подходов привела к разработке методологии, которая в значительной степени опирается на синтетическую и аналитическую химию для идентификации взаимодействия белок-малая молекула и белок-метаболит. Методы, основанные на аффинитете, по-прежнему являются наиболее распространенным подходом, с последующей их интеграцией в современную протеомику [D.J.Adams et al., 2012].

Хотя и отставая от степени изученности взаимодействия белок-белок, методологический портфель для установления взаимодействия белок-метаболит был значительно расширен в недавнем прошлом. В сочетании с более ранними биохимическими исследованиями, новые методы способствовали увеличению числа известных взаимодействий белок-метаболит. База данных BRENDA сообщает о более 4500 уникальных регуляторных взаимодействиях для *E. coli* и более 1500 для *Saccharomyces cerevisiae* [S.Placzek et al., 2017]. Принимая во внимание, что во многих исследованиях сообщается, что половина из недавно обнаруженных данных ранее не были известны [Y.V.Nikolaev et al., 2016; D.Hoglinger et al., 2017], можно предположить, что подавляющее большинство таких взаимодействий все еще не обнаружено. Методы, ориентированные на сам интермедиат, в настоящее время имеют наибольший потенциал для создания карты взаимодействия *in vivo*, в частности в сочетании с методами анализа протеома [M.Diether, U.Sauer, 2017].

Таким образом, успешной концепцией для изучения функциональных особенностей малых молекул представляется следующая схема исследования: определение прогнозируемого спектра биологической активности с применением современных компьютерных технологий, определение интересующей области и потенциальных белковых

партнеров для подтверждения научной гипотезы, постановка модельных экспериментов, раскрывающих те или иные свойства изучаемой молекулы.

Настоящее исследование выполнено в рамках Федеральной программы: «Взаимодействие биологически активных веществ растительного и животного происхождения с системами жизнедеятельности организма с учетом биологической вариабельности метаболизма, ассоциированной с групповой принадлежностью крови» (номер гос. регистрации 0120.0809698).

Степень разработанности темы исследования. Межмолекулярные взаимодействия являются основой функционирования организма и поддержания его гомеостаза, а взаимодействия на уровне малых молекул определяют успешность протекания этих процессов. Однако, в последнее десятилетие приоритет изучения отдавался взаимодействиям белок-белок, белок-ДНК, белок-РНК, оставляя в тени такой важный пласт взаимодействий как белок-малая молекула. Публикации о взаимодействии белок-метаболит стали появляться лишь с 2009 года [Li X. et al., 2013].

Ранее научной школой Ф.Н. Гильмияровой использовались некоторые метаболиты, такие как пируват и этанол, в качестве молекулярных маркеров для изучения и оценки процессов белок-белкового взаимодействия [Ф.Н.Гильмиярова и соавт., 2013]. Полученные данные обозначают необходимость дальнейших исследований, посвященных молекулярным механизмам взаимодействия внутри- и внеклеточных метаболитов с различными биологическими структурами (белки, ферменты, гормоны).

Особого внимания среди представителей малых молекул заслуживает лактат - известный интермедиат биохимических путей, когда-то считавшийся тупиком анаэробного метаболизма. Сегодня же известно, что образование лактата происходит непрерывно в аэробных условиях [G.A.Brooks, 2018]. Согласно данным литературы, лактат выполняет по крайней мере три важнейшие задачи: служит основным источником энергии, глюконеогенным прекурсором и сигнальной молекулой, а в клинической медицине признана взаимосвязь между повышением уровня лактата крови и тяжестью заболевания или травмы [J.L.Vincent et al., 2016].

Смене концепции понимания роли лактата способствовал ряд работ, посвященных изучению внутри- и межклеточных систем переноса этого соединения [L.B.Gladden, 2008]. Недавно опубликованные данные демонстрируют наличие гормоноподобных, рецепторных и сигнальных способностей у лактата [M.Taher et al., 2016; D.Rawat et al., 2019]. Описаны механизмы функционирования внутри- и межклеточных каналов, с помощью которых происходит обмен лактатом, а также взаимодействие лактата с рецептором GPR81. Разрабатываются вопросы, касающиеся изучения роли лактата в патогенезе многих онкологических заболеваний [S.Sun et al., 2017], но все еще нераскрытой остается область влияния данной малой молекулы на процессы фермент-субстратного и белок-белкового взаимодействия, также как и характеристика полного спектра возможных биологических эффектов лактата, что обозначает перспективы дальнейшего исследования.

Цель исследования – охарактеризовать структурно-функциональный потенциал лактата и изучить влияние этого интермедиата на внутри- и межмолекулярные взаимодействия: белок-белковые, фермент-субстратные, конформационную лабильность каталитических белков.

Задачи исследования:

1. Изучить прогнозируемый спектр биологической активности интермедиата лактата с использованием программы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) и выявить потенциальных белковых партнеров взаимодействия с применением компьютерной среды STITCH 5.0 (Searching Tool for Interacting Chemicals);

2. Определить содержание лактата, пирувата, активность лактатдегидрогеназы (лактатдегидрогеназная каталитическая система) в зависимости от групповой принадлежности крови по системе AB0;

3. Исследовать влияние лактата на процессы белок-белкового взаимодействия, используя в качестве экспериментальной системы антигены групп крови АВ0 (гликопротеины А и В), естественные и моноклональные антитела;

4. Визуализировать изменения, вызываемые внесением лактата в экспериментальную систему на образование комплексов антиген-антитело с использованием методов конфокальной лазерной сканирующей микроскопии;

5. Методами микрокапиллярного термофореза и дифференциальной сканирующей флуориметрии установить факт взаимодействия оксалоацетата с каталитическим белком лактатдегидрогеназой и выявить влияние этого интермедиата на термостабильность лактатдегидрогеназы при нагревании до 90⁰С и при физиологическом диапазоне температур;

6. Выявить влияние оксалоацетата на функционирование лактатдегидрогеназной каталитической системы: определить активность лактатдегидрогеназы в прямой и обратной реакции под влиянием оксалоацетата в диапазоне концентраций.

Научная новизна:

1. Компьютерное моделирование биологической активности лактата с использованием программного обеспечения PASS и установление возможных белковых взаимодействий, спрогнозированных в программе STITCH, позволило описать спектр прогнозируемой активности исследуемого интермедиата и установить наиболее вероятных белковых партнеров для изучения межмолекулярных взаимодействий (семейство растворимых белков переносчиков SLC16A, белок-рецептор лактата HCAR1, нейротрофический белок MTRNR2L2, прекурсор амилоидного белка APP).

2. Показана ассоциированность лактатдегидрогеназной каталитической системы с групповой принадлежностью крови по системе АВ0. Лица, имеющие В (III) группу крови, имеют наибольшую активность лактатдегидрогеназы и содержание лактата и пирувата, а лица с 0 (I) группой крови – наименьшую активность лактатдегидрогеназы при достаточно высоких показателях лактата и пирувата.

3. Впервые получен блок данных, раскрывающий особенности взаимодействия комплексов антиген-антитело на примере антигенов групп крови АВ0, а также естественных и моноклональных антител при внесении в экспериментальную систему лактата. Выявлена разнонаправленность действия лактата на антигены А и В, а также различная чувствительность к введению лактата естественных и моноклональных антител. Разработан способ оценки влияния лактата на аффинитет связи белок-лиганд (патент № 2680408 от 21.02.2019 «Способ выявления влияния низкомолекулярных биологически активных веществ на аффинитет белок-лигандной связи»).

4. Ранее не описано использование метода конфокальной лазерной сканирующей микроскопии для визуализации белок-лигандного взаимодействия антиген-антитело в условиях влияния лактата с целью количественной оценки результатов взаимодействия.

5. Впервые получены результаты, описывающие изменение конформационной устойчивости каталитического белка лактатдегидрогеназы в температурном градиенте при добавлении оксалоацетата, предложен новый подход для количественной оценки вызванных малой молекулой изменений (патент №2698628 от 13.06.2019 «Способ выявления влияния низкомолекулярных биологически активных веществ на конформацию белка»).

6. Впервые описано протекторное воздействие низких концентраций (0,5-2 мкМ) оксалоацетата на конформацию каталитического белка лактатдегидрогеназы, которое проявляется в увеличении термостабильности молекулы белка. Впервые показано, что оксалоацетат в 1 мкМ концентрации увеличивает активность лактатдегидрогеназы в прямой реакции, с увеличением концентрации оксалоацетата наблюдается дозозависимое ингибирующее воздействие на каталитическую систему.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты исследования имеют практическое и теоретическое значение. Значимость работы заключается в раскрытии регуляторной роли лактата в процессах белок-белкового взаимодействия, его влиянии на процессы межмолекулярного узнавания. В ходе проведенных исследований была

разработана основа для выполнения модельных экспериментов *in vitro*, позволяющих изучить особенности взаимодействия в системе белок-белок при внесении в эту систему низкомолекулярного лиганда на примере ключевого метаболита лактата. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности использования данной системы при проведении различных модельных экспериментов. Лактат демонстрирует разнонаправленное влияние на антигенные детерминанты А и В, что доказывает избирательность действия данного вещества и позволяет использовать описанную экспериментальную систему при работе с различными соединениями – метаболитами, лекарственными препаратами, гормонами.

Спектр биологической активности, полученный с использованием компьютерной программы PASS, раскрывает многообразие функций и потенциальных эффектов лактата, что может быть использовано при дальнейших более углубленных исследованиях отдельных эффектов этого соединения. Карта взаимодействий с белковыми структурами, предсказанная программой STITCH, дает возможность выбрать наиболее вероятные мишени взаимодействия для проведения последующих экспериментов.

С практической точки зрения полученные результаты важно учитывать при проведении таких лабораторных методов исследования как иммуноферментный анализ, иммунохемилюминесцентный анализ, в основе которых лежит процесс белок-белкового взаимодействия, чувствительного к изменению концентрации лактата. Также необходимо учитывать способность лактата оказывать модифицирующее влияние на различные биологические процессы, что особенно важно при проведении анализов у пациентов в состоянии, сопровождающемся гиперлактатемией. Специфика реакции антигенных детерминант А и В при введении различных веществ в эту систему диктует необходимость учета групповой принадлежности крови по системе АВ0 при назначении лекарственных препаратов.

Методология и методы исследования. Проведение диссертационного исследования проводилось в соответствии с разработанным диссертантом планом, для выполнения которого использовались адекватные биофизические, биохимические и статистические методы, оборудование современного уровня и пакеты прикладных программ. Было проведено моделирование спектра биологической активности лактата с использованием программы PASS и установление потенциальных белковых партнеров взаимодействия при использовании компьютерной среды STITCH 5.0.

В исследовании приняли участие 210 клинически здоровых лиц (143 женщины и 67 мужчин), средний возраст которых составил $26,8 \pm 1,4$ лет. Биологическим материалом служила венозная кровь. Всем участникам проводилось определение групповой принадлежности крови по системе АВ0, а также содержания лактата, пирувата и активности лактатдегидрогеназы. С использованием полученного биологического материала проводилось исследование влияния лактата на взаимодействие антиген-антитело иммуногематологическими методами, а также визуализация комплексов антиген-антитело и количественная оценка вызванных изменений, образовавшихся под влиянием метаболита лактата при помощи конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

Вторая часть исследования проводилась с использованием чистого белка лактатдегидрогеназы из мышц кролика тип XI (лиофилизат, Sigma Aldrich, США) и оксалоацетата (Sigma Aldrich, США). С применением метода микрокапиллярного термофореза подтверждали факт взаимодействия лактатдегидрогеназы и оксалоацетата, рассчитывали константу диссоциации. Оценивали изменения в конформации и термолабильности лактатдегидрогеназы при влиянии меняющихся концентраций оксалоацетата с применением методов дифференциальной сканирующей флуориметрии. Определяли влияние оксалоацетата на функцию монокаталитического белка лактатдегидрогеназы путем постановки прямой и обратной лактатдегидрогеназной реакции в условиях внесения диапазона концентраций оксалоацетата.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Лактат обладает широким спектром биологической активности и имеет значительное количество потенциальных белковых партнеров взаимодействия, что было установлено с применением программного обеспечения PASS и STITCH. Наиболее значимыми эффектами лактата являются: иммуностимулирующий, иммуномодулирующий, противовоспалительный, противоопухолевый, а белками-кандидатами - семейство растворимых белков переносчиков SLC16A, белок-рецептор лактата HCAR1, нейротрофический белок MTRNR2L2, прекурсор амилоидного белка APP.

2. Лактатдегидрогеназная каталитическая система проявляет биологическую вариабельность, ассоциированную с групповой принадлежностью крови по системе АВ0. Для лиц, имеющих В (III) группу крови, характерна высокая активность лактатдегидрогеназы, наибольшее содержание лактата и пирувата, а для лиц с 0 (I) группой крови – наименьшая активность лактатдегидрогеназы при достаточно высоком содержании лактата и пирувата.

3. Эндогенный интермедиат лактат способен влиять на взаимодействия белок-белок, что было доказано на примере реакции антиген-антитело с применением экспериментальной системы групп крови АВ0. Антигенные детерминанты проявляют различную чувствительность к введению лактата: степень ответа гликопротеина А превосходит таковую гликопротеина В. Установлено увеличение времени начала вступления в реакцию агглютинации антигенов эритроцитов с естественными и моноклональными антителами под влиянием лактата.

4. Метод конфокальной лазерной сканирующей микроскопии является информативным для визуализации белок-лигандного взаимодействия антиген-антитело в условиях влияния лактатом с целью количественной оценки результатов взаимодействия.

5. Конформационная устойчивость лактатдегидрогеназы изменяется при влиянии оксалоацетата. Низкие концентрации оказывают протекторное действие на конформацию лактатдегидрогеназы, что выражается в увеличении ее термостабильности. Высокие концентрации оказывают дестабилизирующее влияние на конформацию, снижают термостабильность лактатдегидрогеназы. Наблюдаемые эффекты сопровождаются изменением функциональной активности белка: низкие концентрации оксалоацетата оказывают активирующее влияние на лактатдегидрогеназу, более высокие – ингибирующее. Наблюдается дозозависимое действие оксалоацетата в проявлении эффекта ингибирования.

Степень достоверности и апробация работы. Диссертационное исследование выполнено с использованием адекватных и информативных методов исследования. Полученный и анализируемый в работе материал включает достаточное количество проведенных лабораторных и биохимических исследований. Статистическую обработку результатов проводили на персональном компьютере с помощью пакета прикладных программ SPSS 21 (IBM SPSS Statistics, USA, лицензия № 20130626-3). Предварительная обработка данных проводилась в программе Excel 2016.

Результаты исследований были представлены на X всероссийской (84-Итоговой) студенческой научной конференции "Студенческая наука и медицина XXI века: традиции, инновации и приоритеты" с международным участием (Самара, 2016), международной конференции BIT's 7th Annual World DNA and Genome Day (Китай, 2016), XI всероссийской (85-Итоговой) студенческой научной конференции "Студенческая наука и медицина XXI века: традиции, инновации и приоритеты" с международным участием (Самара, 2017), Международной научной конференции по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» и VIII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» с конкурсом работ молодых учёных (Москва, 2017), XII Всероссийской (86-й Итоговой) студенческой научной конференции "Студенческая наука и медицина XXI века: традиции, инновации и приоритеты" с международным участием (Самара, 2018), XV международной заочной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные науки сегодня» (США, 2018), V международной конференции «Постгеном'2018 в поисках моделей персонализированной медицины» (Казань, 2018), Московско-Токийском

международном медицинском форуме (Токио, 2018), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Аспирантские чтения-2019» (Самара, 2019), XVII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «ЮУНМУ. Медицинская наука и клиническая практика» (Челябинск, 2019), международной научно-практической конференции «Saratov Fall Meeting 2019» (Саратов, 2019), V съезде биохимиков России (Дагомыс, 2019), совместном заседании коллективов кафедр фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой; медицинской биологии, генетики и экологии; фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, Института экспериментальной медицины и биотехнологий ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава РФ (Самара, 2020).

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликовано 27 печатных работ, из них 13 – в изданиях, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий или входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук и издания, приравненные к ним, в том числе получено 2 патента и 1 свидетельство на ЭВМ.

Внедрение результатов исследования. Результаты диссертационного исследования применяются в учебном процессе на кафедре фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава РФ, а также используются в работе клинко-диагностических лабораторий: Клиник ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава РФ, ГБУЗ СОКБ им. В.Д. Середавина, ГБУЗ СОДКБ им. Н.Н. Ивановой.

Личный вклад автора. Личный вклад автора в получении научных результатов, изложенных в диссертации, состоял в проведении научно-информационного поиска, анализе и обобщении данных литературы по профилю диссертационного исследования, формулировке цели и задач, в моделировании возможных свойств и механизмов действия лактата, в проведении серии модельных экспериментов по изучению белок-белкового взаимодействия *in vitro*, постановке экспериментов с применением методов микрокапиллярного термофореза и дифференциальной сканирующей флуориметрии, а также по оценке влияния оксалоацетата на функционирование каталитической системы лактатдегидрогеназы, выполнении статистической обработки полученных результатов исследования, подготовке текста и иллюстрированного материала диссертации.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 207 страницах машинописного текста с приложениями и состоит из введения, 5 глав, заключения и списка литературы, иллюстрирована 12 таблицами и 47 рисунками. Указатель литературы содержит 342 источника, из которых 41 отечественных и 301 зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на кафедре фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, в клинко-диагностической лаборатории Клиник ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет», на кафедре радиотехнических устройств ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева», в лаборатории молекулярной и радиационной биофизики Петербургского университета ядерной физики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт». Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

Под наблюдением находились 210 клинически здоровых лиц, состояние которых подтверждалось отсутствием инфекционных и других социально значимых заболеваний, а также хронической соматической патологии. Всеми участниками было подписано информированное добровольное медицинское согласие. В наблюдаемую группу вошли 143 женщины и 67 мужчин, средний возраст составил $26,8 \pm 1,4$ лет. Всем обследованным

проводилось определение принадлежности крови по системе АВ0, содержания лактата, пирувата, активности лактатдегидрогеназы.

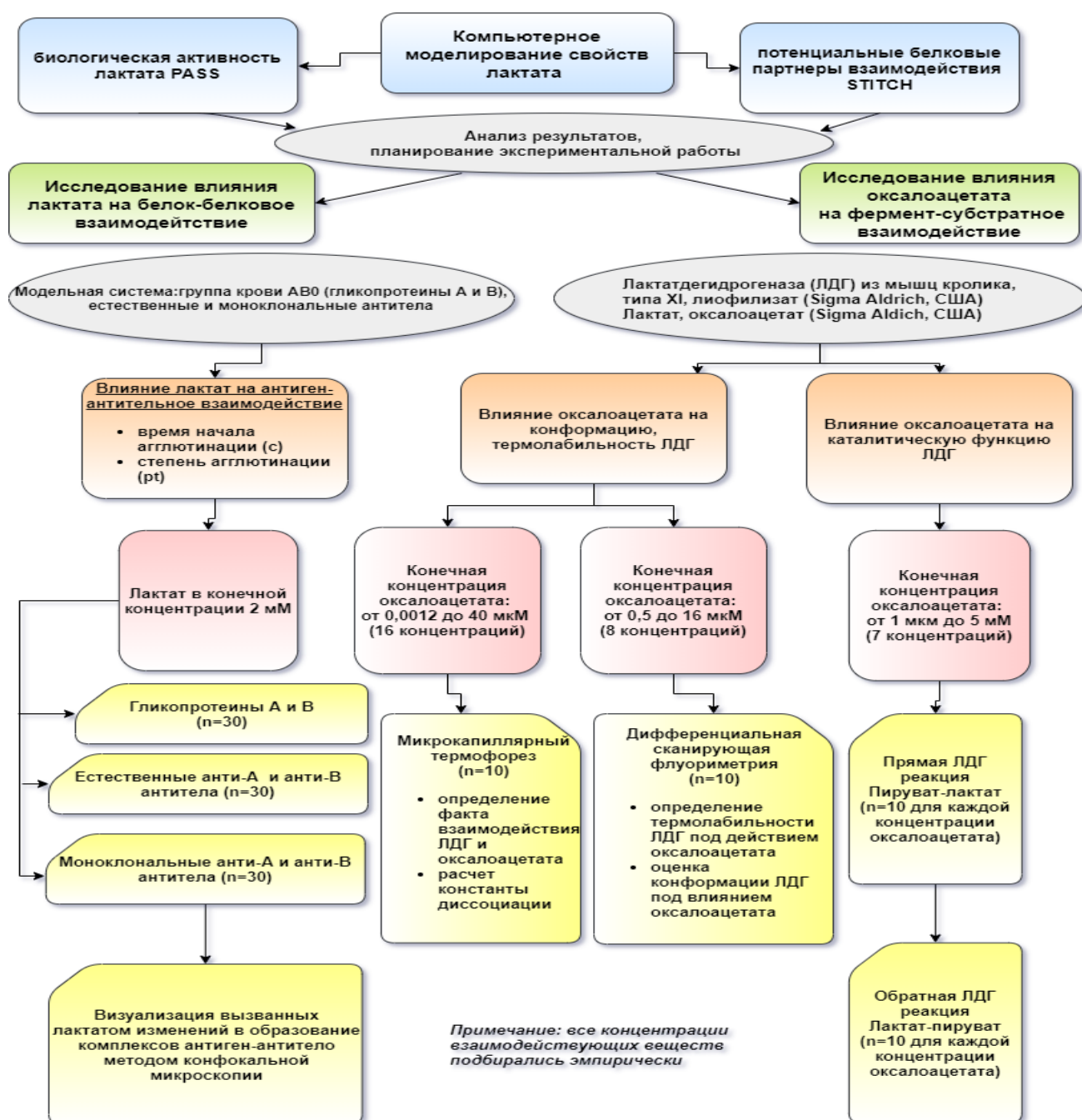


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Группу крови по системе АВ0 определяли перекрестным методом на плоскости с использованием моноклональных антител эритроцест-целиклоны анти-А, анти-В, анти-Д Супер ООО «Гематолог» и набора стандартных эритроцитов 0(I), А(II), В(III) групп производства ГБУЗ «Самарская областная клиническая станция переливания крови». Определение группы крови также проводилось на автоматическом анализаторе «Хемос СП II» (Bio-Rad, США) с применением реактивов TransClone Anti-AB01 (А), Anti-AB02 (В), Anti-AB03 (AB) (BIO-Rad, США). Агглютинацию оценивали по балльной шкале (pt) W.L.Marsh. Распределение по групповой принадлежности крови в исследуемой группе было следующим: доля лиц с 0(I) группой крови составила 29,6%, с А(II)– 31,8%, с В(III)– 24,3%, с АВ(IV)– 14,3%.

Измерение содержания лактата, пирувата, активности лактатдегидрогеназы в крови практически здоровых лиц с 0 (I)- АВ (IV) группами крови проводили на приборе Cobas Integra 400plus (Roche Diagnostics, Швейцария).

Принцип определения содержания лактата основан на окислении лактата до пирувата под действием лактатоксидазы с образованием пероксида водорода. Измерение содержания пирувата проводили с применением ферментативного каталитического метода. Под воздействием лактатдегидрогеназы происходит окисление пирувата до лактата, что сопровождается окислением НАДН в НАД в равных соотношениях. Общую активность лактатдегидрогеназы определяли с помощью ферментативного кинетического метода. В ходе реакции под действием фермента происходит окисление лактата до пирувата с одновременным восстановлением НАД до НАДН в равных соотношениях, при этом скорость перехода НАД в НАДН прямо пропорциональна активности лактатдегидрогеназы. Измерение абсорбции производится при длине волны 340 нм.

Компьютерное моделирование биологической активности лактата проводилось с использованием программы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), а моделирование потенциальных белковых партнеров – в программе STITCH (Search Tool for Interacting Chemicals).

Экспериментальной системой для изучения влияния лактата на процесс белок-белкового взаимодействия была выбрана модель групп крови по системе АВ0. В качестве антигенов выступали поверхностные гликопротеины эритроцитов А и В, в качестве антител – естественные анти-А и анти-В антитела плазмы и моноклональные анти-А и анти-В антитела. Концентрация лактата подбиралась эмпирически и составляла 2 мМ. Влияние лактата на систему «антиген-антитело» оценивали, используя два параметра: степень и время начала агглютинации.

Постановку эксперимента осуществляли в три этапа: на первом этапе оценивали влияние лактата на антигенные детерминанты А и В путем инкубации лактата в количестве 20 мкл (2 мМ) со 100 мкл цельной крови с дальнейшей постановкой реакции агглютинации со стандартными моноклональными антителами. Влияние лактата на антитела оценивали путем отдельной инкубации лактата с естественными и моноклональными анти-А и анти-В антителами и дальнейшей постановкой реакции агглютинации со стандартными эритроцитами. Степень гемагглютинации оценивалась численно в баллах от 0 до 12 по шкале, разработанной W.L.Marsh [W.L.Marsh, 1972].

Визуализацию влияния лактата на образование комплексов антиген-антитело проводили с использованием конфокального микроскопа Olympus IX 71 (Япония) со сканирующим блоком и лазерным комбайном (ANDOR). Применяли режимы микроскопии в видимом свете и в режиме лазерной флуоресценции. Оценка площади кадра, занимаемого агрегатами, проводилась с помощью программы Andor IQ.

Во всех последующих экспериментах мы использовали реактивы фирмы Sigma-Aldrich, США:

- лактатдегидрогеназа (ЕС 1.1.1.27, ЛДГ, L-Lactic Dehydrogenase, L-LDH) из мышцы кролика, тип XI, лиофилизат, 848 Ед/мг белка;
- оксалоацетат;
- буфер Трис-HCl 50мМ, рН 7,5;
- буфер PBS 100мМ рН 7,4.

Эксперименты с применением метода микрокапиллярного термофореза, позволяющего установить факт взаимодействия лиганда с белком, а также вычислить константу диссоциации, выполняли на оборудовании Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies GmbH). Мечение лактатдегидрогеназы осуществляли с использованием стандартного набора L001 для маркировки белка «Monolith NT Protein Labeling Kit RED-NHS». Непореагировавший «свободный» краситель удаляли методом гельфильтрации. Для расчета константы диссоциации (Kd) методом микротермофореза готовили серию разведений, где конечная концентрация ЛДГ подбиралась эмпирически и составляла 1,65 мкМ, а количество

добавляемого лактата варьировало от 40 мкМ до 0,0012 мкМ. Реакционную смесь вносили в объеме 4 мкл в специализированные капилляры с последующим проведением термофореза.

Оценку конформационной лабильности белка проводили на приборе Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies, Германия). Регистрировали изменение эндогенной флуоресценции триптофана и тирозина при длине волны 330 и 350 нм. Результат записывался в градусах Цельсия, что соответствовало температуре плавления белка (T_m) (точка температурного перехода), когда половина молекулы белка подверглась тепловой денатурации, а половина – сохранила свою конформацию. Для проведения эксперимента готовили разведения лактатдегидрогеназы и лактата. Концентрация фермента составила 1 мкМ, конечная концентрация лактата составляла 16 мкМ, 8 мкМ, 4 мкМ, 2 мкМ, 1 мкМ и 0,5 мкМ. Полученную реакционную смесь в объеме 10 мкл помещали в капилляры Prometheus NT.48 (nanoDSF grade). Диапазон нагрева составил от 20°C до 95°C, шаг 1°C /мин, интенсивность лазера 30%.

Влияние оксалоацетата на лактатдегидрогеназную систему оценивалось путем постановки прямой и обратной лактатдегидрогеназной реакции на автоматическом биохимическом анализаторе Cobas Integra 400plus (Roche Diagnostics, Швейцария). Все реактивы разводили в PBS буфере (Phosphate buffered saline, Sigma Aldrich, США), pH=7,4. Готовили серию разведений, в которых конечная концентрация оксалоацетата подбиралась эмпирически и составила: 1 мкМ, 10 мкМ, 0,1 мМ, 1 мМ, 1,5 мМ, 2 мМ и 5 мМ. Время инкубации ЛДГ с оксалоацетатом подбиралось экспериментально и составило 5 минут при комнатной температуре до постановки пробы в анализатор. Старт биохимической реакции происходил на борту анализатора путем добавления НАДН для прямой реакции и НАД⁺ для обратной. В опытной и контрольной пробах производили расчет содержания белка. Принцип метода основан на образовании окрашенного комплекса при взаимодействии аминокислот, входящих в состав молекулы белка с молибдатом натрия и пирогаллоловым красным. На основании полученных данных об активности фермента и содержания белка в пробе проводили расчет удельной активности фермента (МЕ/мг белка).

Статистическую обработку полученных результатов проводили на персональном компьютере с помощью пакета прикладных программ SPSS 21 (IBM SPSS Statistics, USA, лицензия № 20130626-3). Предварительная обработка данных проводилась в программе Excel 2016. Анализ полученных в исследовании данных показал, что требуется применение как параметрических, так и не параметрических подходов к описанию результатов. Межгрупповые сравнения проводили с использованием теста Манна-Уитни, t-критерия Стьюдента.

Для анализа кривых плавления лактатдегидрогеназы при влиянии оксалоацетата нами была разработана математическая модель:

$$f(t) = d + \frac{c - d}{1 + e^{-a(t-b)}}$$

Это четырехпараметрическая S-образная кривая, где: $f(t)$ – зависимая переменная, соотношение флуоресценции на длинах волн 330 и 350 нм; t – независимая переменная, температура, °C; a , b , c , d — параметры уравнения, или регрессионные коэффициенты.

Представленный вариант аналитической зависимости относится к кривым, имеющим сигмоидальную форму, которые хорошо подходят для моделирования явлений роста с насыщением [M.J.Crawley, 2007], в том числе и для различных медицинских и биологических целей [J.W.Findlay, R.F.Dillard, 2007; J.M.Rizzo et al., 2015; A.T.Goshu, P.R.Коуа, 2013]. Выбор данной математической модели для настоящего исследования обусловлен удобной содержательной интерпретацией её параметров:

a – отражает скорость плавления;

b – соответствует теоретической точке перегиба и температуре, при которой скорость плавления максимальна;

c – асимптотически минимальное соотношение поглощений на изучаемых длинах волн;

d – асимптотически максимальное соотношение поглощений на изучаемых длинах волн.

Оценку адекватности построенных моделей проводили графо-аналитическим способом по анализу наблюдаемых и оцененных по регрессионному уравнению значений; выполняли анализ регрессионных остатков и соответствие их распределения нормальному закону. Качество аппроксимации оценивали по статистической значимости моделей в целом, коэффициентам детерминации и стандартным ошибкам регрессий.

Для оценки влияния оксалоацетата на конформацию ЛДГ в диапазоне физиологической температуры 36,5-37,5°C использовали следующие статистические подходы: сравнение различных концентраций оксалоацетата выполняли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующими апостериорными сравнениями с контролем, либо между всеми возможными комбинациями попарных сравнений из изученных семи концентраций по критерию Даннетта.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мы обратились к методам *in silico* с целью моделирования потенциальной биологической активности молекула лактата. С применением программы PASS было предсказано наличие 318 фармакологических эффектов, 2108 возможных механизмов действия, 177 метаболически опосредованных действий. Интересным представляется предсказанная способность лактата выступать регулятором иммунных реакций, проявлять иммуномодулирующее, иммуностимулирующее, противовирусное, противовоспалительное действия, а также оказывать антибактериальный эффект. Особую значимость в контексте разработок препаратов для лечения различных новообразований приобретает наличие у лактата противоопухолевого эффекта, спрогнозированного с достаточно высокой степенью вероятности (рисунок 2).

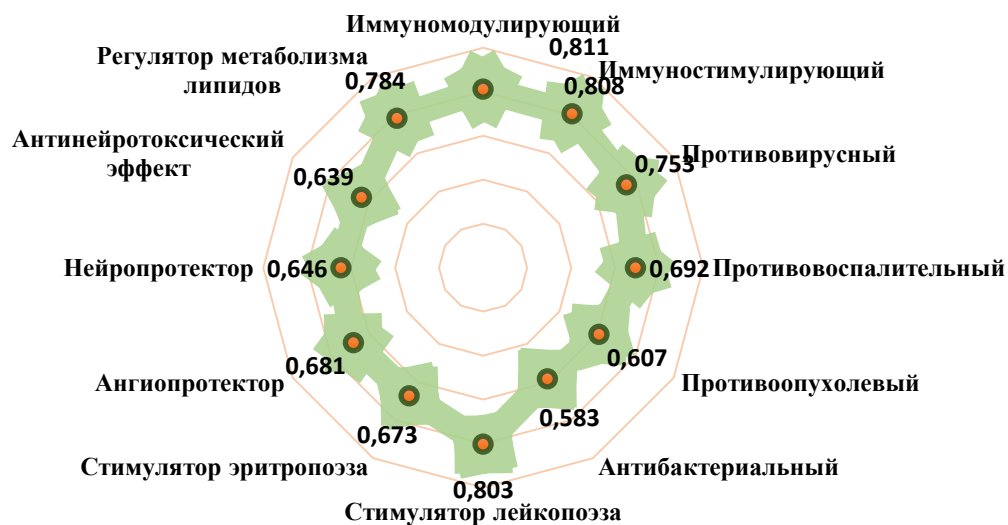


Рисунок 2 – Наиболее вероятные биологические эффекты лактата, смоделированные программой PASS

При оценке молекулярных механизмов действия, предсказанных методом компьютерного моделирования, обращает на себя внимание возможность лактата выступать ингибитором следующих ферментов: пируваткарбоксилазы, глиоксилатредуктазы, лактоназы, фосфоенолпируватмутаза. Также предсказана способность лактата выступать в качестве агониста фактора роста нервов, инсулиноподобного фактора роста, антагониста рецепторов тиреоидного гормона, фибриногена.

Далее мы обратились к программе STITCH, способной анализировать и моделировать с высокой степенью вероятности потенциальных белковых партнеров лактата. Показано наличие 367 белков-кандидатов, степень вероятности взаимодействия с которыми составляет более 0,5. На рисунке 3 представлены наиболее вероятные белковые партнеры ($P_a > 0,9$) –

рецептор лактата HCAR1, мускариновые холинергические рецепторы, а также дофаминовые, серотониновые, глутаматные рецепторы.

Проведенный анализ прогнозируемых активностей лактата в программах PASS и STITCH позволил нам сформировать целостное представление о множественных и разнонаправленных метаболических и регуляторных эффектах описываемого метаболита. Представляется трудноосуществимым изучение функциональной роли лактата на выделенном фрагменте метаболома человека, что диктует необходимость поиска подходов для осуществления этой задачи. Антиген-антительное взаимодействие, будучи разновидностью белок-белковых взаимодействий, вместе с тем является достаточно изолированным, доступным для анализа и количественной оценки. Задача нашего дальнейшего исследования заключалась в изучении эффектов лактата, оказываемых на взаимодействия белок-белок в экспериментах *in vitro* с использованием модельной системы групп крови АВ0 (гликопротеинов А и В), естественных и моноклональных антител.

Перед проведением этого эксперимента нами была изучена ассоциированность лактатдегидрогеназной каталитической системы (содержание лактата, пирувата, активность лактатдегидрогеназы) в зависимости от групповой принадлежности крови по системе АВ0 (таблица 1). Выявлена биологическая вариабельность в содержании данных показателей: лица с 0 (I) и В (III) группами крови имели более высокие показатели лактата, пирувата, активности лактатдегидрогеназы в то время как лица с А (II) и АВ (IV) – более низкие, причем среди лиц с АВ (IV) группой крови было установлено наименьшее содержание лактата и пирувата.

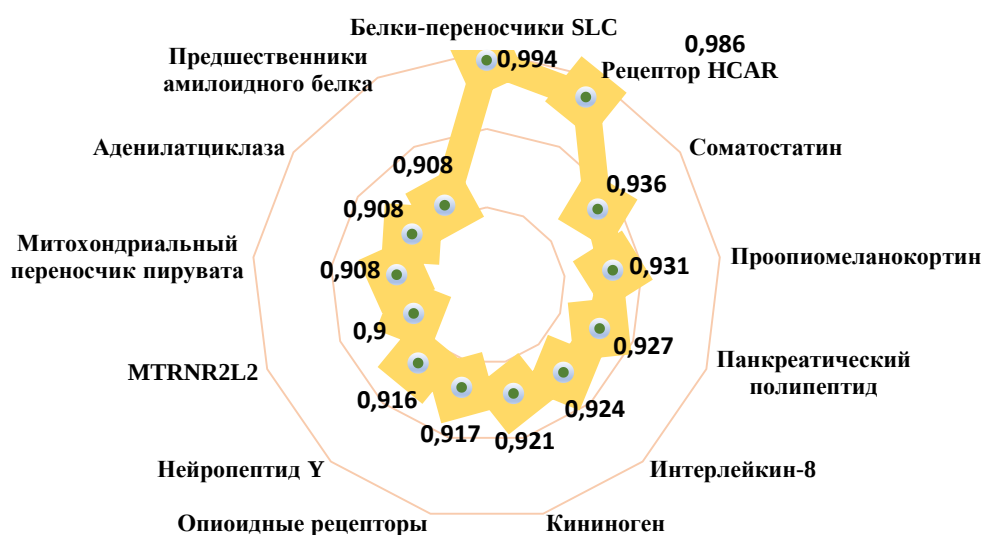


Рисунок 3 – Предсказанные программой STITCH белки для взаимодействия с лактатом ($P_a > 0,9$)

На первом этапе нашего эксперимента мы оценивали влияние лактата на эритроциты А (II) и В (III) групп крови. В качестве изучаемых параметров были выбраны время начала агглютинации в секундах. Установлено, что введение лактата в экспериментальную систему приводит к замедлению начала вступления антигенов А и В в реакции агглютинации.

Время агглютинации эритроцитов А (II) группы крови, имеющих на своей мембране антиген А, замедляется на 41,6%, для эритроцитов В (III) группы, несущих на своей поверхности антиген В, уменьшение времени агглютинации составило 16,6%. Отметим, что антиген А у лиц с АВ (IV) группой крови демонстрировал наибольшую реакционную активность: время начала агглютинации изменилось на 50%.

Таблица 1 – Лактатдегидрогеназная система в зависимости от групповой принадлежности крови по системе АВ0

		Лактат ммоль/л	Пируват ммоль/л	Лактат/Пируват	ЛДГ Е/л
0(I)	M±m	2,26±0,15	0,052±0,002	48,23±6,02	364,22±18,12
	95% CI	1,87 – 2,58	0,047-0,057	36,05±60,51	320,83– 388,17
А (II)	M±m	2,02±0,12	0,050±0,002	40,67±1,96	384,44±13,01
	95% CI	1,63 – 2,16	0,046-0,053	36,71±44,64	354,49– 411,26
В (III)	M±m	2,27±0,14	0,053±0,002	45,26±2,82	393,79±18,41
	95% CI	1,87 – 2,54	0,048-0,054	38,24±49,83	351,94–440,76
АВ (IV)	M±m	2,01±0,18	0,047±0,002	42,41±2,94	377,82±16,40
	95% CI	1,39 – 2,89	0,046-0,059	36,18±48,65	347,26– 463,85
Ген. совокупность	M±m	2,15±0,07	0,051±0,001	43,91±2,02	379,81±8,38
	95% CI	1,92 – 2,27	0,049-0,053	39,91±47,91	361,61– 398,04

Далее мы исследовали влияние лактата на естественные антитела плазмы крови и моноклональные антитела. Анти-В антитело плазмы крови в данном эксперименте показало большую чувствительность к введению лактата в сравнении с анти-А антителом: степень агглютинации уменьшилась на 62,5% в сравнении с контролем и составила 3 pt по W.Marsh, контроль – 8 pt. Моноклональные анти-А анти-В антитела реагировали на внесение лактата одинаково: изменения составили 75% в сравнении с группой контроля.

Полученные микрофотографии образования комплексов антиген-антитело при введении лактата свидетельствуют об увеличении процесса агрегации. Объем кадра, содержащий комплексы гликопротеинов при введении в систему лактата, составил 6,7% для антигенов А (рисунок 4Б) и 0,3% для антигенов В соответственно (рисунок 4Г), площади образованных комплексов составили 50,4 мкм² при взаимодействии с гликопротеином А и 17,7 мкм² при взаимодействии с гликопротеином В.

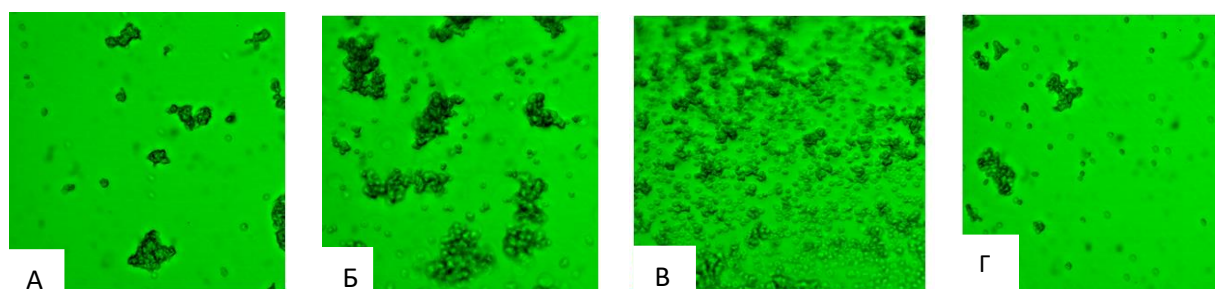


Рисунок 4 – Электронная микрофотография взаимодействия гликопротеинов А и В с моноклональными антителами в режиме основного рассеивания (увеличение 400).

А – гликопротеин А (контроль); Б – гликопротеин А после инкубации с лактатом;
В – гликопротеин В (контроль); Г – гликопротеин В после инкубации с лактатом

Изученный тип взаимодействия между антигенами гликопротеиновой природы и естественными и моноклональными антителами является достаточно изолированным и дает возможность количественной оценки изменений, вместе с тем однозначно исключить вклад ряда факторов в наблюдаемое явление не представляется возможным. Важным шагом в изучении воздействия низкомолекулярных лигандов на белковые структуры является

проведение экспериментов с участием индивидуальных белков. В качестве объекта нашего дальнейшего изучения был выбран монокаталитический белок лактатдегидрогеназа (лактатдегидрогеназная каталитическая система), а в качестве низкомолекулярного лиганда - оксалоацетат. По своему строению данный метаболит сходен с одним из субстратов лактатдегидрогеназной реакции, пируватом, отличаясь наличием дополнительной карбоксильной группы.

В качестве инструмента для характеристики взаимодействия оксалоацетата и лактатдегидрогеназы мы использовали метод микрокапиллярного термофореза. Обработка данных с применением программного обеспечения позволила получить сглаженную s-образную кривую и произвести расчет константы диссоциации (рисунок 5).

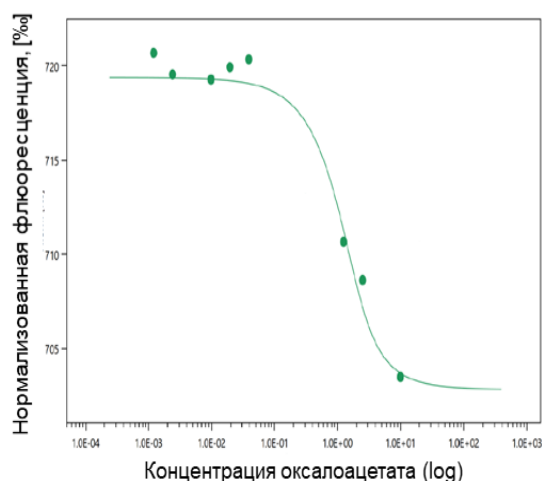


Рисунок 5 – Анализ взаимодействия ЛДГ при постоянной концентрации (1.65 мкМ) и оксалоацетата в изменяющейся концентрации с применением программного обеспечения Nano Temper Analysis Software Package. Расчетное значение K_d составляет 0.5 мкМ

Отметим, что в большинстве случаев константа диссоциации численно соответствует константе Михаэлиса-Ментен. Более того, использование константы Михаэлиса-Ментен для описания сродства связи фермента к субстрату справедливо лишь при принятии гипотезы стационарного состояния, что редко соответствует реальным условиям проводимого эксперимента [B.F.Lasseter, 2019]. Полученное нами расчетное значение K_d для оксалоацетата при взаимодействии с ЛДГ составило 0,5 мкМ, для сравнения приведем полученные значения для субстратов ЛДГ - лактата ($K_d=0,2$ мкМ) и пирувата ($K_d=0,03$ мкМ). Представленное значение K_d свидетельствует о достаточно сильном сродстве низкомолекулярного соединения оксалоацетата к молекуле фермента ЛДГ. Одним из возможных объяснений наблюдаемому явлению может являться структурная аналогия истинного субстрата ЛДГ пирувата и оксалоацетата: обе эти молекулы являются α -кетокислотами и отличаются содержанием одного атома углерода. Нами был произведен расчет структурной аналогии оксалоацетата с пируватом в программе calcDrugFPSim, было установлено, что уровень схожести пирувата и оксалоацетата является достаточно высоким и составляет 0,685.

Дифференциальная сканирующая флуориметрия является одним из методов оценки термостабильности белков в различных условиях, в том числе после связывания с малыми молекулами-лигандами [A.Simeonov, 2013]. Термин «плавление» (англ.-melting) отражает изменения, происходящие с ЛДГ во время осуществления эксперимента и широко используется в отечественной литературе при применении методов, позволяющих оценить термостабильность белка, например, дифференциальной сканирующей калориметрии, инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье [А.Г.Белозеров и соавт., 2016; А.М.Куркин и соавт., 2018]. Мы готовили серию из 6 разведений, в которых конечная концентрация оксалоацетата изменялась от 16 до 0,6 мкМ, а конечная концентрация

фермента оставалась неизменной и составила 1 мкМ. После проведения визуального анализа исходных скаттерограмм была подобрана математическая модель для аппроксимации данных по соотношению значений флуоресценции, полученных во время проведения эксперимента по нагреванию молекулы белка. Температурный градиент, для которого проводилось моделирование процесса плавления, составил 48-63°C. Коэффициенты детерминации полученных моделей были в диапазоне от 98,5% до 99,7%, а стандартные ошибки регрессии, соответственно, от 0,0026 до 0,0018. Регрессионные коэффициенты для различной концентрации оксалоацетата приведены в таблице 2.

Обращает на себя внимание, что при небольшой разнице в температуре плавления ЛДГ отмечается различное состояние комплексов ЛДГ-оксалоацетат, что проявляется различной глубиной пика (рисунок 6). Температуре плавления ЛДГ с различными концентрациями оксалоацетата соответствует самая глубокая точка образовавшегося пика на кривой первой производной. Наблюдаемое изменение глубины образованных пиков объясняется различным влиянием концентраций оксалоацетата на термостабильность молекулы. Так, концентрации оксалоацетата 0,5-2 мкМ оказывают протективное воздействие на конформацию ЛДГ, повышая ее температуру плавления, а концентрация оксалоацетата 16 мкМ приводит к нахождению ЛДГ в более развернутой конформации, снижает ее термостабильность.

Таблица 2 – Переменные регрессионной модели, моделирующей процесс плавления ЛДГ под влиянием оксалоацетата в различных концентрациях

Концентрация, мкМ	Параметры регрессионной модели			
	a	b	c	d
16	0,732 (0,697–0,767)	55,9 (55,8–56,0)	0,759 (0,758–0,759)	0,814 (0,814–0,815)
8	0,780 (0,756–0,804)	56,3 (56,2–56,3)	0,736 (0,735–0,736)	0,807 (0,807–0,808)
4	0,788 (0,768–0,809)	56,4 (56,3–56,4)	0,726 (0,726–0,727)	0,804 (0,803–0,804)
2	0,778 (0,759–0,797)	56,4 (56,4–56,4)	0,722 (0,722–0,723)	0,802 (0,802–0,803)
1	0,767 (0,746–0,788)	56,3 (56,3–56,4)	0,722 (0,722–0,723)	0,802 (0,801–0,802)
0,5	0,755 (0,735–0,775)	56,3 (56,3–56,4)	0,719 (0,719–0,720)	0,800 (0,799–0,800)
Контроль ЛДГ	0,728 (0,698–0,757)	56,1 (56,0–56,1)	0,748 (0,747–0,748)	0,809 (0,808–0,809)

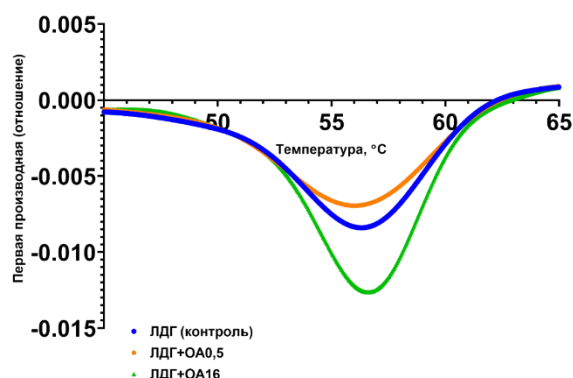


Рисунок 6 – Участок первой производной кривой плавления лактатдегидрогеназы при взаимодействии с оксалоацетатом в концентрации 0,5 мкМ и 16 мкМ

Было проведено более детальное моделирование поведения кривой плавления лактатдегидрогеназы под влиянием различных концентраций оксалоацетата на участке физиологического диапазона температур 36,5-37,5°C (рисунок 7). Проанализировано 29 измерений отношений флуоресценций в различных точках заявленного коридора температур. Установлено, что влияние концентрации оксалоацетата на конформацию ЛДГ статистически значимо ($p < 0,005$), что проявляется в изменении интенсивности флуоресценции. Отсутствие статистически значимой зависимости было выявлено для концентраций оксалоацетата 2 и 4 мкМ. Оксалоацетат в диапазоне концентраций от 0,5-2 мкМ вызывает снижение соотношения флуоресценции по сравнению с контролем ($p < 0,001$), при этом наиболее выраженный эффект оказывает наименьшая из изученных концентрация лиганда — 0,5 мкМ. При концентрации 8 мкМ соотношения флуоресценции находятся на уровне контроля, а концентрации оксалоацетата 16 мкМ приводит к увеличению соотношения флуоресценции существенно выше контроля ($p < 0,001$).

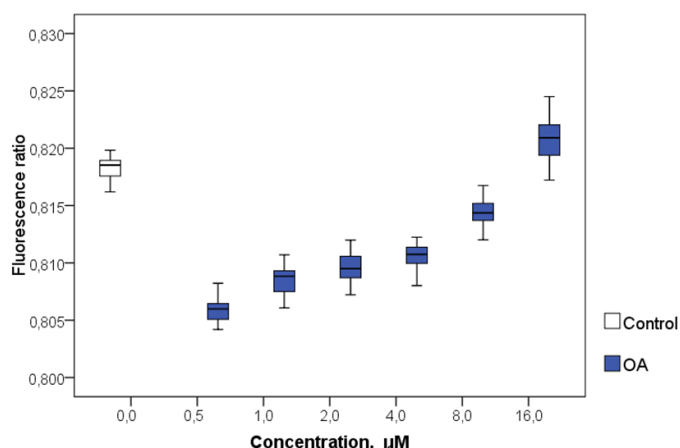


Рисунок 7 – Сравнение влияния различных концентраций оксалоацетата на термостабильность ЛДГ при 36,5-37,5°C

Далее нами было изучено влияние оксалоацетата на функциональное проявление лактатдегидрогеназной каталитической системы. Проводили постановку прямой и обратной лактатдегидрогеназной реакции при добавлении оксалоацетата в концентрации 1 мкМ – 5 мМ. При анализе полученных результатов обращает на себя дозозависимое влияние оксалоацетата на активность ЛДГ. При постановке прямой реакции (пируват-лактат) внесение оксалоацетата в реакционную смесь в конечной концентрации 0,1 мМ ($p=0,01$), 1 мМ ($p=0,001$), 1,5 мМ ($p<0,0001$), 2 мМ ($p<0,0001$) приводило к нарастающему снижению активности ЛДГ (рисунок 5.11), а увеличение концентрации до 5 мМ вызывало полное ингибирование каталитической активности белка (рисунок 8).

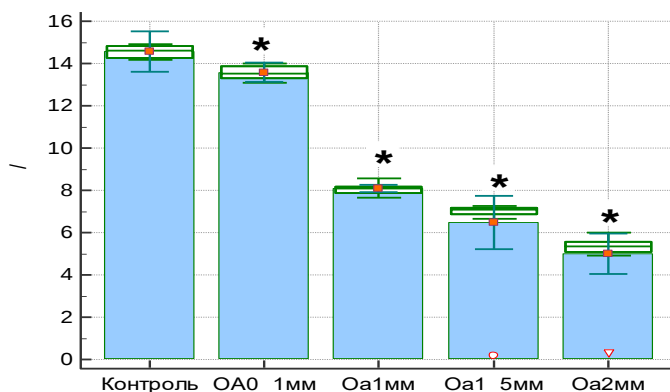


Рисунок 8 – Влияние оксалоацетата на активность лактатдегидрогеназы в прямой реакции (пируват-лактат), E/ мг белка. * $p < 0,05$

Вместе с тем, добавление оксалоацетата в конечной концентрации 10 мкМ и 1 мкМ оказывало активирующее влияние на ЛДГ. При этом влияние оксалоацетата в концентрации 1 мкМ оказалось статистически значимым ($p=0,006$). Активность ЛДГ в контрольном образце составила $14,5 \pm 0,19$ Е/мг белка, а после добавления оксалоацетата в концентрации 1 мкМ составила $15,5 \pm 0,13$ Е/мг белка (рисунок 9). Интересно отметить, что добавление этих же концентраций оксалоацетата при постановки обратной реакции (лактат-пируват) не оказало активирующего эффекта, напротив, снижая активность ЛДГ: контрольный образец - $2,95 \pm 0,1$ Е/мг белка, после внесения 1 мкМ оксалоацетата - $2,64 \pm 0,08$ Е/мг белка ($p=0,03$). Оксалоацетат в конечной концентрации 0,1 мМ ($p=0,03$), 1 мМ ($p<0,0001$), 1,5 мМ ($p<0,0001$), 2 мМ ($p<0,0001$) оказывает ингибирующее влияние на активность ЛДГ в обратной реакции, причем нарастание ингибирующего эффекта имеет прямую зависимость от вносимой концентрации лиганда.

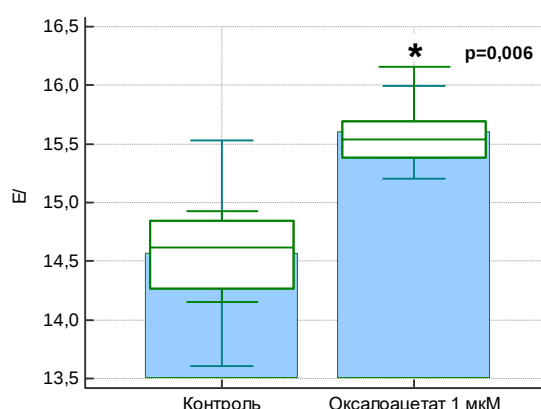


Рисунок 9 – Влияние оксалоацетата в конечной концентрации 1 мкМ на протекание прямой лактатдегидрогеназной реакции (пируват-лактат) * $p<0,05$

Полученные нами результаты свидетельствуют о достоверном факте взаимодействия оксалоацетата и лактатдегидрогеназы. Выявлено дозозависимое влияние оксалоацетата на конформацию фермента, что также измеряется в изменении его функционального проявления: более низкие концентрации оксалоацетата оказывают стабилизирующее воздействие на конформацию и активирующее – на функцию лактатдегидрогеназы, а более высокие – дестабилизируют конформацию белка и ингибируют его функцию.

ВЫВОДЫ

1. С применением методов *in silico* (моделирование в компьютерных средах PASS и STITCH) выявлено многообразие спрогнозированных проявлений биологической активности лактата и потенциальных белковых партнеров для взаимодействия. Предсказана высокая вероятность наличия у лактата регуляторных свойств: изменение метаболических потоков внутри клетки, координирование витальных функций в организме человека – синтез и релизинг гормонов, участие в иммунновоспалительных реакций, а также потенциальное нейропротекторное и противоопухолевое действия.

2. Выявлены характерные группоспецифические особенности лактатдегидрогеназной каталитической системы для лиц с 0 (I)- АВ (IV) группами крови. Наибольшая активность лактатдегидрогеназы, содержание лактата и пирувата зарегистрировано среди лиц с В (III) группой; наименьшая активность лактатдегидрогеназы при достаточно высоких показателях лактата и пирувата выявлена у лиц с 0 (I) группой крови. Наименьшее содержание лактата и пирувата отмечено у обладателей АВ (IV) группы крови.

3. Внесение лактата в экспериментальную систему замедляет процесс вступления гликопротеинов А и В в реакцию с антителами. Гликопротеин А, терминальный углеводный фрагмент которого представлен N-ацетилгалактозамином, показывает большую

чувствительность к лактату, что проявляется в большем увеличении времени начала агглютинации по сравнению с гликопротеином В с терминальным моносахаридом D-галактозой.

4. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия позволяет не только визуализировать, но и производить количественную оценку результатов влияния лактата на образование комплексов антиген-антитело. Комплексы, образованные с антигеном А, характеризуются более крупным размером, многообразностью формы и большим количеством эритроцитов, входящих в состав агглютинатов. Эти конгломераты занимают большую часть объема кадра микрофотографии. Агглютинаты, образованные с антигеном В, имеют более простую форму и меньшее количество составляющих элементов, площадь кадра, занимаемая ими, сравнительно мала в сравнении с антигеном А.

5. С применением метода микрокапиллярного термофореза установлен факт взаимодействия оксалоацетата с каталитическим белком лактатдегидрогеназой. Рассчитана константа диссоциации $K_d=0,5$ мкМ. Показано дозозависимое влияние оксалоацетата на стабильность лактатдегидрогеназы при воздействии температурного фактора: концентрации оксалоацетата 0,5-2 мкМ оказывают протекторное воздействие, сдвигая точку температурного перехода в область более высоких значений; концентрация оксалоацетата 16 мкМ дестабилизирует конформацию лактатдегидрогеназы, приводя к более раннему наступлению точки температурного перехода.

6. Изменение конформационной стабильности лактатдегидрогеназы имеет функциональные проявления: 1 мкМ концентрация оксалоацетата повышает активность лактатдегидрогеназной каталитической системы, при увеличении концентрации оксалоацетата наблюдается дозозависимый ингибирующий эффект на активность фермента.

7. Функциональный потенциал лактата, обусловленный его структурными особенностями, проявляется как в выполнении метаболической роли, так и в участии во внутри- и межклеточных взаимодействиях, в частности, белок-белковых и фермент-субстратных, при этом вызывая изменение конформационной лабильности и функциональной активности каталитических белков.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для исключения интерферирующего влияния гиперлактатемии при работе с высокотехнологичными лабораторными методами (иммуноферментный, иммунохемилюминесцентный, методы молекулярной диагностики) надо учитывать содержание лактата у каждого пациента.

2. Рекомендуется включить в перечень биохимического обследования определение содержания оксалоацетата: содержание данного метаболита может оказывать разнонаправленное действие на функциональную активность ферментативных белков, что может затруднить выявление патологических метаболических сдвигов, связанных с развитием заболеваний.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Способность низкомолекулярных лигандов на примере лактата и оксалоацетата изменять конформационную стабильность каталитических белков и влиять на их функциональную активность имеет большое значение в вопросе разработки новых лекарственных средств. При определении интересующего белка-мишени возможно подобрать такую концентрацию лиганда, которая будет активировать или ингибировать его функциональные проявления.

Вместе с тем, использование знаний об активирующем воздействии низких доз оксалоацетата является интересным концептом в развитии подходов «митохондриальной» и «биоэнергетической» медицины, когда путем управления содержанием внутриклеточных и, в

частности, митохондриальных метаболитов возможно оказывать влияние на метаболические процессы клетки, меняя направленность энергетических потоков.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. *Лактат: есть ли тупик метаболизма? / Н.А. Колотьева, В.И. Потехина, И.В. Горбачева [и др.] // Наука молодых – *Eruditio Juvenium*. – 2016. – №1. – С. 28–32.
2. *Структурно–регуляторный потенциал лактата / Ф.Н. Гильмиярова, Н.А. Колотьева, В.И. Потехина [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – №2. – С. 1–10.
3. Потехина, В.И. Лактат: есть ли тупик метаболизма? / В.И. Потехина // X Всероссийская (84–я Итоговая) Студенческая научная конференция СНО С международным участием «Студенческая наука и медицина XXI века: Традиции, инновации и приоритеты» Сборник материалов. – Самара: Офорт, 2016. – С. 287.
4. Интермедиаты в регуляции межмолекулярного взаимодействия в лигандных технологиях / Ф.Н. Гильмиярова, В.М. Радомская, В.И. Потехина [и др.] // Лаборатория. – 2016. – №1. – С. 11–12.
5. *Регистрация и учет расходных материалов, анализ количества и качества проведенных исследований в отделе ПЦР–диагностики иммунологической лаборатории / Мельник К.Н., Баишева Г.М., Алпатова Т.А., Шадрина Л.В., Кучеров Д.И., Горбачева И.В., Потехина В.И.), Гуркова Е.А., Гильмиярова Ф.Н. // Свидетельство для государственной регистрации программы для ЭВМ № 201611308; заявка № 2018109670 от 08.12.2015; зарегистрировано в Реестре программ для ЭВМ 29.01.2016.
6. *Белок–лигандные взаимодействия: влияние минорных компонентов метаболизма / Ф.Н. Гильмиярова, Е.А. Рыскина, В.И. Потехина [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. – 2017. – №6(108). – С. 12–21.
7. Прогнозируемая и экспериментально подтвержденная роль пирувата и лактата в межмолекулярном взаимодействии белковых структур / Ф.Н. Гильмиярова, В.М. Радомская, В.И. Потехина [и др.] // Здоровье, демография, экология финно-угорских народов. – 2017. – №3. – С. 58–60.
8. *Роль лактата в межмолекулярной регуляции взаимодействия белковых структур / Ф.Н. Гильмиярова, Н.А. Колотьева, В.И. Потехина [и др.] // Медицинский Альманах. – 2017. – №2. – С. 99–101.
9. Биомолекулы и взаимодействие между ними / Е.А. Рыскина, Ф.Н. Гильмиярова, В.И. Потехина [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2017. – №6–1. – С. 97–101.
10. Визуализация взаимодействия белковых структур / Ф.Н. Гильмиярова, О.А. Гусякова, В.И. Потехина [и др.] // *Acta Naturae*. Спецвыпуск. – 2017. – С. 75.
11. Потехина, В.И. Визуализация взаимодействия минорных компонентов метаболизма с белковыми структурами / В.И. Потехина, Н.А. Колотьева // Материалы научно–практической конференции с международным участием "Научные достижения молодых ученых XXI века в рамках приоритетных направлений стратегии научно–технологического развития страны". – Самара: Офорт, 2017. – С. 220–221.
12. Потехина, В.И. Как убедиться в межмолекулярном взаимодействии белковых структур? / В.И. Потехина // XI Всероссийская (85–я Итоговая) Студенческая научная конференция СНО С международным участием «Студенческая наука и медицина XXI века: Традиции, инновации и приоритеты»: сборник материалов. – Самара: Офорт, 2017. – С. 287.
13. Abo–blood groups system and morbidity / F. Gilmiyarova, V. Radomsкая V. Potekhina [et al.] // *European journal of natural history*. – 2017. – №1. – P. 14–20.
14. *Клинико–молекулярные особенности стоматитов у пациентов с острыми и хроническими лейкозами / И.А. Селезнева, Ф.Н. Гильмиярова, В.И. Кузьмичева [и др.] // Медицинский альманах. – 2018. – №5(56). – С. 230–235.

15. **Kuzmicheva, V.I.** Lactate: not only a key metabolite but a regulator of antigen–antibody reaction / **V.I. Kuzmicheva** // TOMO FORUM 2018.Towards Medical Excellence in Eurasia. – Tokyo: JMRF, 2018. – P. 72.
16. Гильмиярова, Ф.Н. Визуализация взаимодействия интермедиатов малой молекулярной массы со структурами белковой природы / Ф.Н. Гильмиярова, Н.А. Колотьева, **В.И. Кузьмичева** // Материалы XV международной научно–практической конференции Наука в современном информационном обществе. – North Charlston: CreateSpace Independent Publishing Platform, 2018. – С. 50–53.
17. **Кузьмичева, В.И.** Об особенностях межмолекулярного взаимодействия малых молекул с белковыми структурами / **В.И. Кузьмичева** // XII Всероссийская (86–я Итоговая) Студенческая научная конференция СНО С международным участием «Студенческая наука и медицина XXI века: Традиции, инновации и приоритеты» Сборник материалов. – Самара: Офорт, 2018. – С. 325.
18. *Группа крови как предиктор гликемии и лактатемии у пациентов в критическом состоянии / **В.И. Кузьмичева, Ф.Н. Гильмиярова, Н.А. Колотьева [и др.]** // Клиническая лабораторная диагностика. – 2019. – №64(4). – С. 216–220.
19. *Особенности показателей коагулограммы в зависимости от антигенного состава группы крови по системе АВ0 / **О.А. Гусякова, Ф.Н. Гильмиярова, В.И. Кузьмичева [и др.]** // Клиническая лабораторная диагностика. – 2019. – №64(3). – С. 170–175.
20. *Секреторный статус ротовой жидкости по антигенам А и В здоровых добровольцев / **И.А. Селезнева, Ф.Н. Гильмиярова, В.И. Кузьмичева [и др.]** // Наука молодых (Eruditio Juvenum). – 2019. – №7 (4). – С. 548–556.
21. Гемостазиологический профиль в зависимости от групповой принадлежности крови по системе АВ0 / **О.А. Гусякова, Ф.Н. Гильмиярова, В.И. Кузьмичева [и др.]** // Наука и инновации в медицине. – 2019. – №4(2). – С. 4–8.
22. ABO Blood Group Antigens as a Model of Studying Protein–Protein Interactions / **F. Gylmiyarova, E. Ryskina, V. Kuzmicheva [et al.]**. – London: Intech Open, 2019. – 77 p.
23. Неканонические функции минорных компонентов метаболизма: компьютерное моделирование и экспериментальное подтверждение / **Ф.Н. Гильмиярова, Н.А. Колотьева, В.И. Кузьмичева [и др.]** // II Объединенный научный форум, VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России, IX Российский симпозиум «Белки и пептиды». Научные труды. Том 2. – М.: Издательство «Перо», 2019. – С. 92.
24. **Кузьмичева, В.И.** Неизвестные структурно–функциональные характеристики известного фермента / **В.И. Кузьмичева, Е.А. Рыскина, М.В. Комарова** // Сборник научных трудов XVII Всероссийской научно–практической конференции молодых ученых и специалистов «ЮУНМУ. Медицинская наука и клиническая практика». – Челябинск: Издательство Южно–уральского государственного медицинского университета, 2019. – С. 71–73.
25. **Кузьмичева, В.И.** Конформация лактатдегидрогеназы при взаимодействии с оксалоацетатом / **В.И. Кузьмичева, В.В. Ремизов** // Сборник научных трудов Всероссийской научно–практической конференции с международным участием «Аспирантские чтения–2019» – Самара: Офорт, 2019. – С. 328–330.
26. *Пат. №2680408 Российская Федерация, G01N 33/53. Способ выявления влияния биологически активных веществ на аффинитет белок–лигандной связи / Колотьева Н.А., Ерещенко А.А., Кузьмичева В.И., Бородина И.А., Гильмиярова Ф.Н., Радомская В.М., Гусякова О.А., Игнатова Н.К., Балдина О.А. ; заявитель и патентообладатель. – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Самарский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации. – № 2018109670; заявл. 19.03.2018; опубл. 21.02.2019; Бюл. № 6. – 1 с.

27. *Пат. №22698628 Российская Федерация, G01N 21/64. Способ выявления влияния низкомолекулярных биологически активных веществ на конформацию белка / Кузьмичева В.И., Гильмиярова Ф.Н., Колотьева Н.А., Рыскина Е.А., Ремизов В.В., Виноградова Д.С. ; заявитель и патентообладатель. – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Самарский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации. – № 2019118363; заявл. 13.06.2019; опубл. 28.08.2019; Бюл. № 25. – 1 с.

* – работа опубликована в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий или входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук и издания, приравненные к ним.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

1. ЛДГ – лактатдегидрогеназа
2. НАД– никотинамидадениндинуклеотид