

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России)

На правах рукописи

Кузьмичева Валерия Игоревна

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

03.01.04 – биохимия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

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

Краснодар – 2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	18
1.1 Лактат как биологически активное соединение	18
1.1.1 Метаболическая роль лактата.....	18
1.1.2 Лактатдегидрогеназная каталитическая система	22
1.1.3. Лигандная роль лактата.....	29
1.2 Увеличенное содержание лактата в крови: причины и следствия	33
1.3 Возможности компьютерного моделирования в определении биологического потенциала низкомолекулярных лигандов	48
1.3.1. Возможности моделирования биологической активности низкомолекулярных лигандов	54
1.3.2. Возможности моделирования белок-лигандного взаимодействия..	56
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	59
2.1 Общая характеристика обследованной группы	60
2.2 Определение группы крови по системе АВ0 и компонентного состава лактатдегидрогеназной каталитической системы	61
2.3 Изучение взаимодействия белок-лиганд с использованием экспериментальной системы антиген-антитело (группы крови АВ0)	64
2.4 Компьютерное моделирование биологической активности лактата в среде PASS.....	66
2.5 Компьютерное моделирование потенциальных белковых партнеров лактата в среде STITCH.....	67
2.6 Визуализация взаимодействия белок-белок методом сканирующей лазерной конфокальной микроскопии	68
2.7 Установление факта взаимодействия оксалоацетата и лактатдегидрогеназы методом микрокапиллярного термофореза	70
2.8 Оценка влияния оксалоацетата на термостабильность лактатдегидрогеназы методом дифференциальной сканирующей	

флуориметрии.....	72
2.9 Определение влияния оксалоацетата на функционирование лактатдегидрогеназной каталитической системы	74
2.10 Статистическая обработка результатов исследования.....	76
ГЛАВА 3. КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛАКТАТА.....	79
3.1 Компьютерное моделирование биологической активности лактата в среде PASS.....	79
3.2 Компьютерное моделирование потенциальных белковых партнеров лактата в среде STITCH.....	91
ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ЛАКТАТА НА БЕЛОК-БЕЛКОВОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ	102
4.1 Характеристика лактатдегидрогеназной каталитической системы в зависимости от групповой принадлежности крови по системе АВ0	102
4.2 Влияние лактата на антиген-антительное взаимодействие на примере модельной системы групп крови АВ0	106
4.2.1 Влияние лактата на гликопротеины А и В.....	106
4.2.2 Влияние лактата на естественные антитела.....	110
4.2.3 Влияние лактата на моноклональные антитела.....	114
4.3 Визуализация влияния лактата на образование комплексов антиген- антитело (гликопротеины А и В).....	119
ГЛАВА 5. ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА КАК МИШЕНЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ ЛИГАНДАМИ.....	125
5.1 Установление факта взаимодействия оксалоацетата и лактатдегидрогеназы методом микрокапиллярного термофореза	126
5.2 Оценка влияния оксалоацетата на термостабильность лактатдегидрогеназы методом дифференциальной сканирующей флуориметрии.....	132
5.3 Определение влияния оксалоацетата на функционирование лактатдегидрогеназной каталитической системы	141

ГЛАВА 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	147
ВЫВОДЫ.....	159
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	161
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	162
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	163
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	200

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Расшифровка структурных, молекулярных и клеточных путей и сигналов, лежащих в основе заболеваний, а также разработка и внедрение молекулярных 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].

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 белок-белковых [L.Jin et al., 2014; V.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].

Контроль над внутриклеточными процессами посредством малых молекул становится особенно актуальным. Многие успехи современной фармакотерапии были достигнуты благодаря раскрытию способностей к ингибированию ферментативных превращений молекулами малой массы, что произвело революцию в медицинской практике [G.M.Burslem, C.M.Crews, 2017]. Кроме того, разработка зондов-малых молекул также способствовала дальнейшему расширению понимания функционирования биологических систем с помощью новых инструментов. Однако не каждый белок обладает ферментативной активностью, и такие белки считаются наиболее сложной мишенью для терапевтического влияния [A.L.Hopkins, C.R. Groom, 2002].

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 сыворотке крови в зависимости от групповой принадлежности крови по системе АВ0;

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 термолабильность лактатдегидрогеназы при нагревании до 90°C 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, нейропротективный белок MTRNR2L2, прекурсор амилоидного белка APP).

2. Показана ассоциированность компонентного состава лактатдегидрогеназной каталитической системы в зависимости от принадлежности 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.

Способность низкомолекулярных лигандов менять конформационную стабильность каталитических белков и влиять на их функциональную активность имеет большое значение в вопросе разработки новых лекарственных средств, в частности, ингибиторов различных ферментов. Вместе с тем, использование знаний об активирующем воздействии низких доз оксалоацетата является интересным концептом в развитии подходов «митохондриальной» и «биоэнергетической» медицины, когда эндогенные метаболиты используются с целью коррекции метаболических потоков клетки.

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, женщин из них – 143 человека, мужчин – 67 человек. Средний возраст в обследуемой группе лиц составлял $26,8 \pm 1,4$ лет. Биологическим материалом служила венозная кровь. Всем участникам проводилось определение групповой принадлежности крови по системе АВ0, а также содержания в крови лактата, пирувата и активности лактатдегидрогеназы. С использованием полученного биологического материала проводилось исследование влияния лактата на взаимодействие антиген-антитело иммуногематологическими методами, определение групповой принадлежности крови по системе АВ0 с помощью моноклональных антител методом прямой агглютинации на плоскости (по инструкции к применению цоликлонов анти-А, анти-В, анти-АВ диагностических жидких для определения групп крови человека системы АВ0), 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 микрокапиллярного термофореза и 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, нейропротективный белок MTRNR2L2, прекурсор амилоидного белка APP.

2. Лактатдегидрогеназная каталитическая система проявляет биологическую вариабельность, ассоциированную с групповой принадлежность 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 оксалоацетатом. 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 клинико-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, анализа и обобщения данных литературы по

профилю диссертационного исследования, формулировки 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.

ГЛАВА 1.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Лактат как биологически активное соединение

1.1.1 Метаболическая роль лактата

В последнее десятилетие произошло образование таких отраслей молекулярной медицины, как митохондриальная и биоэнергетическая, в основе которых лежит понимание основных биохимических циклов и путей поддержания энергетического статуса клетки [R.H.Swerdlow, 2014]. Постулатами данной науки является то, что управление биоэнергетическими потоками способно обратить вспять патологические изменения и замедлить старение клеток. В фокусе внимания находятся интермедиаты, способные в различных концентрациях и при различном внутриклеточном окружении менять энергетический статус клетки и переключать анаболические и катаболические пути [E.L.Davis et al., 2016].

Лактат можно по праву отнести к таким интермедиатам. Еще несколько десятилетий назад о нем говорили как о «метаболите усталости» и «тупиковом» метаболите, сегодня же лактат воспринимается не только как участник важнейших метаболических путей, но и как сигнальная молекула. В некоторых источниках он даже получил название «лактормона» за свои способности к регуляции тонких процессов наравне с субстанциями гормональной природы [G.A.Brooks, 2002].

Стоит отметить, что лактат и молочная кислота не являются синонимичными понятиями. Однако, молочная кислота при pH 7,35-7,45 на 99% диссоциирует с образованием лактат-аниона. Описываемый метаболит может существовать в виде двух стереоизомеров, причем L-лактат в сравнении с D-лактатом более распространен и составляет 95-99% всего количества данного метаболита в организме [I.Gillespie et al., 2017].

Содержание в крови лактата отражает равновесие между его образованием, утилизацией и выведением. В норме концентрация этого

аниона в венозной крови в спокойном состоянии не превосходит 2 ммоль/л. Лактат образуется мышцами (25%), кожей (25%), головным мозгом (25%), кишечником (10%) и клетками крови (20%): общее количество синтезированного лактата в сутки составляет порядка 1500 ммоль [B.Levy, 2006]. Причем эритроциты, поскольку в них не содержатся митохондрии, образуют до 80% всего лактата клеток крови [P.G. Haji-Michael et al., 1999].

Клиренс этого соединения осуществляется печенью (60%), почками (30%) и некоторыми другими органами, например, сердечной и скелетной мышечной тканями [J.Levraut et al., 1998]. Обращает внимание, что до достижения порога переполнения в проксимальных почечных канальцах происходит реабсорбция лактата, в виду того, что он является важным энергетическим субстратом. По достижении порога концентрации 5-6 ммоль/л, лактат начинает экскретироваться с мочой [B.Levy, 2006].

Образованный лактат используется в нескольких метаболических путях, например, цикл Кори, а после окисления до пирувата может участвовать в цикле трикарбоновых кислот и окислительном фосфорилировании. Роль печени в утилизации лактата может возрасть в 10 раз во время физических упражнений [B.Capaldo, 1999]. Потребление лактата составляет 10-15% метаболизма сердечной мышцы в покое и до 30% во время физической нагрузки средней интенсивности [D.Neglia et al., 2007]. Почка образует небольшое количество лактата в мозговом веществе, а его утилизация происходит в корковом веществе [J.A. Kraut, N.E. Madias, 2014].

В недавно проведенном исследовании был установлен вклад лактата в энергетический метаболизм различных видов тканей. Посредством введения меченого радиоизотопами описываемого интермедиата в кровеносное русло измерялась активность поступления лактата в те или иные клетки различных тканей (рисунок 1.1). Отмечено, что лактат является наиболее импортируемым субстратом в ткани: его поступление в 1,1 раза превышает импорт глюкозы при физиологических состояниях, а при голодании этот коэффициент увеличивается до 2,5 [H.Sheng et al., 2017].

Интересно отметить, что концентрация лактата в крови имеет корреляционные взаимосвязи с некоторыми белками ротовой жидкости. Во время физической нагрузки или стрессовой ситуации концентрация лактата в крови имеет прямую взаимосвязь с концентрацией амилазы ротовой жидкости и хромогранина А, что может быть связано с тем, что секреция этих веществ увеличивается во время активации симпатической нервной системы [O.L.Vocanegra et al., 2012].

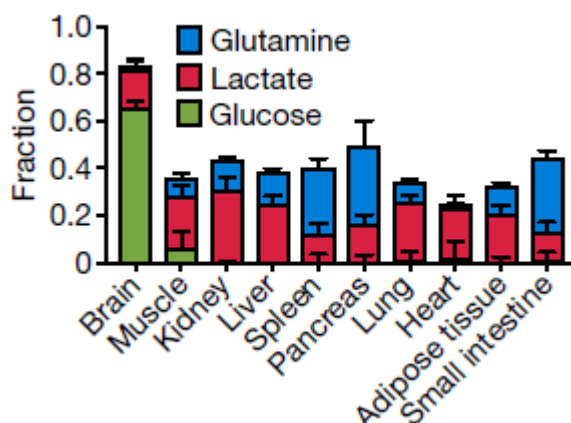


Рисунок 1.1 – Потребление лактата различными тканями и органами [H.Sheng et al., 2017]

Лактат переносится через плазматическую мембрану при помощи монокарбоксилатных транспортеров (MCTs), которые относятся к генному семейству SLC16, в котором на сегодняшний день насчитывается 14 членов [R.S. Jones, M.E.Morris, 2016]. Данные белки представляют собой мембранные протеины с 12 трансмембранными доменами, внутриклеточными NH₂ и COOH терминальными концами и большой цитозольной петлей между трансмембранными доменами 6 и 7. Из всего семейства данных белков наиболее хорошо изучены представители MCT 1-4. Были определены и выделены два якорных белка, входящих в состав этих транспортеров: базиджин (basigin, CD147), необходимый для поддержания потока веществ через плазматическую мембрану и регуляции челночной активности в белковых транспортерах MCT 1,3,4 и эмбиджин (embigin),

играющий важную роль в регуляции экспрессии МСТ2 [М.С. Wilson et al., 2005].

Различные изоформы данных белков-переносчиков имеют неодинаковое сродство к субстратам (лактат, пируват, ацетоацетат, β -гидроксибутират), которые имеют специфичное представительство в тканях и клетках [Sh.Sun et al., 2017]

МСТ-1 экспрессируется в равной степени всеми тканями организма и обладает умеренной аффинностью к своим субстратам ($K_{\text{m lactate}}=3,5-10$ мМ). Цикл переноса лактата этим транспортером включает следующие стадии: присоединение H^+ , присоединение лактат-аниона, конформационные перестройки, во время которых лактат и H^+ проходят через внутриклеточный и внеклеточный сайты связывания, отсоединение лактата и затем отсоединение H^+ (рисунок 1.2). За одну секунду возможно осуществление порядка 12 таких циклов [М.С. Wilson et al., 2009].

МСТ-2 – высокоаффинный транспортер ($K_{\text{m lactate}}=0,5$ мМ), экспрессируется в тканях, активно использующих лактат в качестве энергетического субстрата: головной мозг, сердце, почки, печень, красные мышечные волокна поперечно-полосатой мышечной ткани. Основная функция данного транспортера – импорт лактата внутрь клетки [К.Pierre et al., 2002].

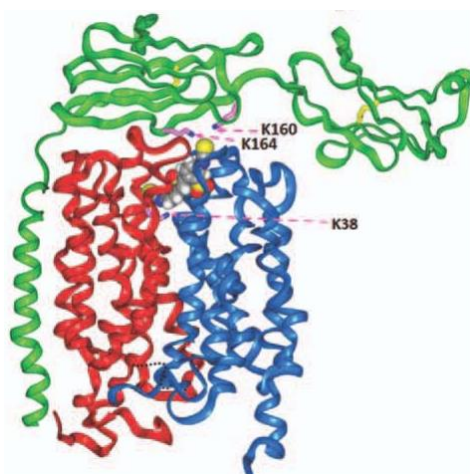


Рисунок 1.2 – Строение монокарбоксилатного транспортера МСТ-1

[А.Р.Halestrap, 2012]

Переносчик МСТ-3 мало изучен ($K_{\text{mlactate}}=6,0 \text{ mM}$). МСТ-4 проявляет слабое сродство к субстрату ($K_{\text{mlactate}}=22,0 \text{ mM}$), экспрессируется в тканях с высоким уровнем гликолитических процессов (белые мышечные волокна поперечно-полосатой мышечной ткани, лейкоциты, астроциты) и выполняет, главным образом, функцию выделения лактата из клетки.

Кроме того, МСТ 4 обладает низкой аффинностью и по отношению к пирувату, что сохраняет его для лактатдегидрогеназной реакции и тем самым поддерживает непрерывное окисление $\text{НАДН}\cdot\text{H}^+$ в НАД^+ , обеспечивая протекание гликолиза [L. H. Bergersen, 2015].

Внутри клетки лактат образуется из пирувата под действием фермента лактатдегидрогеназы. При физиологических условиях равновесие реакции сильно смещено в сторону образования лактата и составляет 10:1 [W.F.Huckabee, 1958]. Восстановление пирувата – единственный и по своей природе уникальный путь образования названного интермедиата.

1.1.2 Лактатдегидрогеназная каталитическая система

Лактатдегидрогеназа (L-lactate +NAD-oxidoreductase, EC 1.1.1.27) представляет собой тетрамерный фермент, принадлежащий к семейству 2-гидроксикислотных оксидоредуктаз, который увеличивает скорость одновременного взаимного превращения пирувата в лактат и НАДН в НАД, и наоборот [Burgner J.W., Ray W.J., 1984]. Реакция включает перенос гидрид-иона с НАДН на углерод C2 пирувата [Pineda J.R. et al., 2007] и обычно используется клетками в реакции анаэробного расщепления глюкозы. Существует четыре гена LDH: LDHA, LDHB, LDHC и LDHD (рисунок 1.3). LDHA, LDHB и LDHC являются L-изомерами, тогда как LDHD является D-изомером. L-изомеры используют или продуцируют L-лактат, который является основным энантиомером, обнаруженным у позвоночных.

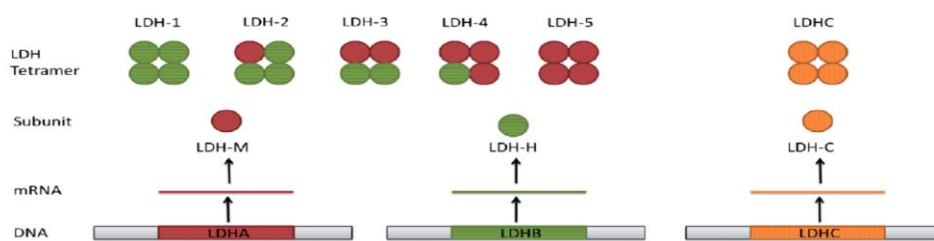


Рисунок 1.3 – Образование лактатдегидрогеназы (ЛДГ) гомо- и тетрамер [Valvona C.J. et al., 2016]

Ген LDHA человека расположен на хромосоме 11p15.4, транскрибированный белок содержит 332 аминокислоты, прогнозируемая молекулярная масса 37 кДа и 24 варианта сплайсинга; человеческий геном также содержит несколько нетранскрибированных псевдогенов LDHA [Tsujiibo H. et al., 1985; Flicek P. et al., 2013]. Эволюционно считается, что LDHA и LDHB возникли в результате дублирования одного LDHA-подобного гена. Считается, что LDHC, специфичный для яичек ген, развился у млекопитающих в результате дупликации гена LDHA после дупликации А-В [Markert C.L. et al., 1975].

LDHA также известен как субъединица М, так как он преимущественно находится в скелетных мышцах, а LDHB также известен как субъединица Н, из-за своего преимущественного нахождения в сердце. В отличие от других генов LDH, которые могут образовывать только гомотетрамеры, LDHA и LDHB могут образовывать гомо- или гетеротетрамеры. Существует пять изоферментов LDH, которые могут быть получены из субъединиц М и Н: LDH-1 (4Н), LDH-2 (3Н, 1М), LDH-3 (2Н, 2М), LDH-4 (1Н, 3М) и ЛДГ-5 (5М) (рисунок 1.3). LDH-1 и LDH-5 имеют идентичные области активного сайта и отличаются только в 81 из 332 аминокислотных положений, большинство из которых находятся в первых 22 и последних 38 остатках и оказывают минимальное влияние на общую структуру [Read J.A. et al., 2001]. N-конец LDHA важен для структурной стабильности, поскольку делеция до 10 аминокислот с N-конца увеличивает нестабильность, гибкость, бездействие и чувствительность к денатурирующим средам [Zheng Y. et al., 2004].

Изоферменты лактатдегидрогеназы имеют неодинаковые кинетические свойства, и исследования показывают, что отличия в кинетике являются результатом различий в заряженных поверхностных остатках, граничащих с активным центром [Read J.A. et al., 2001; K.Urbańska, A. Orzechowski, 2019]. Каждая субъединица лактатдегидрогеназы А имеет суммарный заряд -6 и более высокое сродство к пирувату, предпочтительно превращая пируват в лактат и НАДН в НАД⁺, тогда как каждая субъединица лактатдегидрогеназы В имеет суммарный заряд +1 и более высокое сродство к лактату, преимущественно превращая лактат в пируват и НАД⁺ до НАДН [Kopperschläger G., Kirchberger J., 1996; Read J.A. et al., 2001].

Пируват играет важную роль в обеспечении работы центральных метаболических путей. Вместе с тем, в ранее проведенных исследованиях научной школы Ф.Н.Гильмияровой были описаны и другие функциональные возможности пирувата, например, показана способность этого интермедиата выступать участником и модулятором белок-белковых взаимодействий [Н.А.Колотьева, 2012; Е.А.Рыскина, 2017]. Пируват может образовываться из нескольких источников, включая окисление лактата, трансаминирование аланина или образование из глюкозы во время гликолиза. Перенос пирувата в митохондрии осуществляется при посредничестве митохондриальных переносчиков пирувата. Попав в митохондрию, пируват может превращаться в ацетил-КоА или оксалоацетат [L.R.Gray et al., 2014], вступая в цикл лимонной кислоты и обеспечивая дальнейшую работу дыхательной цепи.

Однако, в условиях недостаточности кислорода клетки не могут использовать окислительное фосфорилирование для эффективного генерирования АТФ. В этом сценарии гликолиз становится основным генератором АТФ, продуцируя 2 молекулы АТФ на молекулу глюкозы. Вместе с тем, наличие НАД⁺ является необходимым для протекания шестой реакции гликолиза, поскольку глицеральдегидфосфатдегидрогеназа использует НАД⁺ для превращения глицеральдегид-3-фосфата в D-1,3-бисфосфоглицерат. НАД⁺ обычно регенерируется посредством

окислительного фосфорилирования с помощью цепи переноса электронов, поэтому, когда поступление кислорода ограничено, НАД⁺ регенерируется из НАДН под действием лактатдегидрогеназы А, чтобы поддерживать гликолиз, при этом в качестве «побочного продукта» образуется лактат. Несмотря на меньшую эффективность данного процесса, анаэробный гликолиз в 100 раз быстрее, чем окислительное фосфорилирование, что позволяет ему удовлетворять кратковременные потребности в энергии при отсутствии достаточного количества кислорода за счет большего потребления глюкозы [Valvona C.J. et al., 2016].

Разные ткани в организме имеют разные скорости метаболизма, энергетические потребности и функции, которые часто отражаются в их соотношении ЛДГ А : ЛДГ В. Например, приблизительно 40% лактата в кровотоке выделяется скелетными мышцами, тогда как печень и почки преимущественно поглощают лактат из кровеносного русла и окисляют его для синтеза глюкозы [Adeva-Andany M. et al., 2014]. Метаболизм мозга сложен, так как он динамически реагирует на изменения концентрации глюкозы и лактата в крови. Исследование шести здоровых мужчин показало, что в состоянии покоя мозг окисляет приблизительно 10% L-лактата крови, обеспечивая 8% потребности в энергии мозга, но все же выделяет небольшое количество чистого L-лактата [van Hall G. et al., 2009]. Однако во время физической нагрузки при развившемся состоянии гиперлактатемии вклад лактата в энергетическое обеспечение головного мозга может достигать 60 % [Overgaard M. et al., 2012; van Hall G. et al., 2009] при этом в покое использование лактата в качестве энергетического субстрата не превышает 33% [Adeva-Andany M. et al., 2014; Overgaard M. et al., 2012].

Промоторная область LDHA содержит консенсусные последовательности и регулируется основными факторами транскрипции: индуцируемым фактором гипоксии 1 (HIF1) и c-Мyc [Firth J.D. et al., 1995; Semenza G.L. et al., 1996; Lewis B.C. et al., 1997; Shim, H. et al., 1997]. Позднее белок M1 (FOXO1) [Cui J. et al., 2014] и Kruppel-подобный фактор 4 (KLF4)

[Shi M. et al., 2014] были идентифицированы как регуляторы транскрипции LDHA; однако регулирование LDHA является сложным и далеко не полностью понятным. Известно также, что на транскрипцию LDHA влияют многие факторы, включая лактат [Lu H. et al., 2005], циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) [Miles M.F. et al., 1981], эстроген [Burke R.E. et al., 1978], ErbB2 и фактор 1 теплового шока [Zhao Y.H. et al., 2009], и, вероятно, на него влияют другие неизвестные факторы [Valvona C.J. et al., 2016]. HIF1 α представляет собой альфа-субъединицу фактора транскрипции HIF1, который обычно дезактивируется в нормоксических условиях пролилгидроксилазой. Однако в условиях гипоксии HIF1 α стабилизируется и образует транскрипционный фактор HIF1 с конститутивно экспрессируемой субъединицей HIF1 β . HIF1 способствует транскрипции генов-мишеней, участвующих в метаболизме (включая LDHA), ангиогенезе и апоптозе, которые поддерживают выживание клеток в гипоксической среде. Однако HIF1 α также часто стабилизируется при опухолевых процессах, включая новообразования головного мозга [Reszec J. et al., 2013], другими факторами, такими как сверхэкспрессия изозимов пируваткиназы M2 (PKM2), Ras, протоонкоген тирозинпротеинкиназы Src и ErbB2 и конститутивная активация фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-3-киназы (PI3k), протеинкиназы B (Akt) или путь рапамицина (mTOR) у млекопитающих [Luo W. et al., 2011; Miao P. et al., 2013]. Регуляция LDHA с помощью HIF1 явно сложна, поскольку исследования показали, что LDHA создает петлю положительной обратной связи, усиливая экспрессию HIF1 α в нормоксических условиях за счет усиления продукции лактата, которая ингибирует пролилгидроксилазу [Lu H. et al., 2005].

С 1960-х годов известно, что экспрессия лактатдегидрогеназы колеблется по мере прохождения клеток через клеточный цикл [Klevecz R.R., 1968, 1969]. В 1991 году L.Pan с коллегами обнаружили, что экспрессия LDHA в нормальных человеческих Т и В-лимфоцитах увеличивается, когда клетки активируются и пролиферируют, демонстрируя, что изоферменты

лактатдегидрогеназы можно использовать в качестве пролиферативных маркеров. Они также отметили, что интенсивность экспрессии лактатдегидрогеназы А находилась на самом высоком уровне, когда большинство Т- и В-лимфоцитов находились в фазе S / G2 / M, и снижалась, когда клетки возвращались в состояние покоя [Pan L. et al., 1991]. С тех пор ЛДГ используется в качестве маркера пролиферации и мобилизации клеток CD34+ для афереза стволовых клеток [Egan K. et al., 2007; Donmez A. et al., 2013]. Более поздние исследования начали прояснять роль ЛДГ А в клеточном цикле. Например, ингибирование активности ЛДГ А вызывало остановку клеточного цикла G2 / M путем подавления пути CDK1 / cyclin B1 в клеточных линиях [Zhai X. et al., 2013], в то время как S-фазовый переход был значительно индуцирован избыточной экспрессией ЛДГ А [Rong Y. et al., 2013]. Механизм, посредством которого ЛДГ А влияет на клеточный цикл, требует дополнительного изучения.

Гликолиз и тканевое дыхание являются тесно связанными процессами. Научная группа Fantin V. R. показала, что подавление аэробной продукции лактата напрямую влияет на дыхание митохондрий. Когда активность ЛДГ А была ингибирована, потребление кислорода и активность системы окислительного фосфорилирования увеличивались, и митохондриотоксическое соединение F16 накапливалось в органеллах; однако потенциал митохондриальной мембраны снижался, а скорость продукции АТФ была также снижена, особенно при гипоксии [Fantin V.R. et al., 2006].

Роль ЛДГ А в окислительном фосфорилировании связана с активностью фумаратгидратазы. Этот фермент превращает фумарат в малат, и его ингибирование может привести к снижению окислительного фосфорилирования и увеличению активности гликолиза. Ингибирование ЛДГ А на фоне дефицита фумаратгидратазы может стимулировать клетки к увеличению окислительного фосфорилирования. Возможное объяснение состоит в том, что дефицит фумаратгидратазы приводит к повышенной

регуляции HIF-1 α , которая индуцирует экспрессию ЛДГ А [Xie H. et al., 2009; Ashrafian H. et al., 2010].

ЛДГ может быть ассоциирована с некоторыми молекулярными комплексами: лактатдегидрогеназа А ассоциируется с нуклеозиддифосфаткиназой (NDPK-A), АМРК- α 1 и казеинкиназой 2 (СК2), а лактатдегидрогеназа В ассоциируется с локальным NDPK-B. Связывание лактатдегидрогеназы с этими комплексами оказывает обратное влияние на ацетил-СоА-карбоксилазу, регулируя ферментативную активность *in vivo* как АМРК, так и СК2, тем самым влияя на окислительно-восстановительный статус клеток [Jovanovic S. et al., 2007].

Метаболизм опухолевых клеток изменяется по сравнению с метаболизмом нормальных клеток и известен как эффект Варбурга [Warburg O., 1956]. Раковые клетки используют ЛДГА для повышения уровня гликолиза, АТФ и выработки лактата даже при наличии кислорода [Kim J.W., Dang C.V., 2006]. Исследования показывают, что переход к аэробному метаболическому фенотипу гликолиза приносит пользу опухолевым клеткам, избегая возникновения окислительного стресса в цепи переноса электронов [Kroemer G., Pouyssegur J., 2008]. Кроме того, используя аэробный гликолиз для генерирования АТФ, опухолевые клетки могут использовать промежуточные соединения цикла лимонной кислоты (которые регенерируются за счет поступления глюкозы и пирувата) для анаболических реакций с целью синтеза липидов, жирных кислот и нуклеотидов, необходимых для быстрой пролиферации клеток [Deberardinis R.J. et al., 2008; Vander Heiden M.G. et al., 2009]. Такой тип метаболизма, используемый клетками новообразований, является привлекательной мишенью для специфической терапии онкологических заболеваний [Pescqueur C. et al., 2013; Zhao Y. et al., 2013].

Аномальная активация LDHA и пониженная регуляция LDHB является общей характеристикой опухолей, которая способствует метаболическому переключению на аэробный гликолиз, генерируя лактат в качестве побочного

продукта. Было показано, что повышенные концентрации лактата предсказывают высокий уровень злокачественности, рецидива, выживаемости и метастазирования опухоли [Walenta S. et al., 2000; Brizel D.M. et al., 2001; Walenta S., Mueller-Klieser W.F., 2004; Miao P. et al., 2013]. Также было показано, что концентрации ЛДГ в сыворотке крови являются прогностическим маркером неблагоприятного прогноза при некоторых типах опухолевых заболеваний [Nieder C. et al., 2012; Jin Y. et al., 2013; Lu R. et al., 2013; Weide B. et al., 2013]. Сверхэкспрессия LDHA также связана со многими другими нежелательными явлениями, включая гипоксию [Semenza, G.L. et al., 1996], ангиогенез, пролиферацию и поглощение глюкозы [Grimm M., 2013], а также устойчивость к химиотерапии [Koukourakis M.I. et al., 2011] и лучевой терапии [Koukourakis M.I. et al., 2014].

1.1.3. Лигандная роль лактата

Интересно, что лактат является лигандом рецептора GPR81. Об открытии десяти новых G-белков было объявлено еще в 2001, после чего более пяти лет они носили название орфанных, поскольку лиганды открытых белков и их функции были неизвестны. В 2008 и 2009 годах были проведены исследования, позволившие установить роль лактата как лиганда во взаимодействии с этим рецептором. Было отмечено, что наибольшая экспрессия рецептора GPR81 приходится на жировую ткань, однако, такие рецепторы были также найдены в скелетной мышечной ткани, почках, головном мозге [H. Ge et al., 2008]. Лактат был выбран в качестве пробного лиганда на основе его известной способности ингибировать липолиз в жировой ткани [V.Qvisth et al., 2007]. Вещества с похожей структурой, такие как пируват, аланин и 3-гидроксипутират не взаимодействовали с указанным рецептором.

Молекулярная масса GPR81 составляет 40 КДа, в своей структуре он имеет внеклеточную NH₂ группу, и внутриклеточную – COOH. Описана критическая значимость шести остатков цистеина, входящих в состав

рецептора, для его функционирования. Рецептор активируется при концентрации лактата 0,2-1 мМ, что соответствует физиологическим значениям [С. Kuei et al., 2011; P. Ranganathan et al., 2018].

Молекулярные процессы, описывающие последствия взаимодействия лактата с рецептором, оказались следующими: активация GPR81 приводит к уменьшению образования цАМФ из АТФ и ослабляет активность протеинкиназы А. Также были получены данные, свидетельствующие о том, что активированный лактатом GPR81 может передавать сигнал и цАМФ-независимым путем, а именно используя внутриклеточный белок β -аррестин [R. Hoque et al., 2014].

Наличие специальных белков-переносчиков и специфичных рецепторов свидетельствует о том, что биологическая функция лактата не описывается лишь участием в энергетических процессах в качестве топлива, а позволяет рассматривать его в качестве сигнальной молекулы.

В качестве примера рассмотрим роль лактата в ЦНС. С одной стороны, известно, что головной мозг наравне с глюкозой может использовать лактат в качестве топливного субстрата. Также отмечено, что при полной глюкозной депривации головной мозг продолжает нормально функционировать за счет механизма высвобождения эндогенного лактата [С.Sobieski et al., 2018]. С другой стороны, лактат проявляет себя как модулятор многих процессов в ЦНС [M.J.Rogatzki et al., 2015]. Образованный в ходе астроцитарного гликолиза, лактат с помощью транспортеров МСТ 1,2 и 4 поступает к нейронам, где стимулирует экспрессию генов, ответственных за долгосрочную память и модулирует синаптическую пластичность [L.F.Varros, 2013]. Регуляция осуществляется через глутаматные NMDAR рецепторы путем повышения внутриклеточного НАДН, увеличение содержания кальция и активации Erk1/2 путей. Нарушение протекания описанных процессов приводит к развитию амнестических состояний [J.Yang et al., 2014].

Кроме этого, влияние лактата отмечено на процессы миелинизации [U.Funfschilling et al., 2012], чувство страха [K.C.Reinert et al., 2011], Са-зависимые сигнальные пути [R.P.Requardt et al., 2012], процессы осмоса [T.Ohbuchi et al., 2010], циркадианные ритмы [T.A.Wang et al., 2012] (рисунок 1.4).

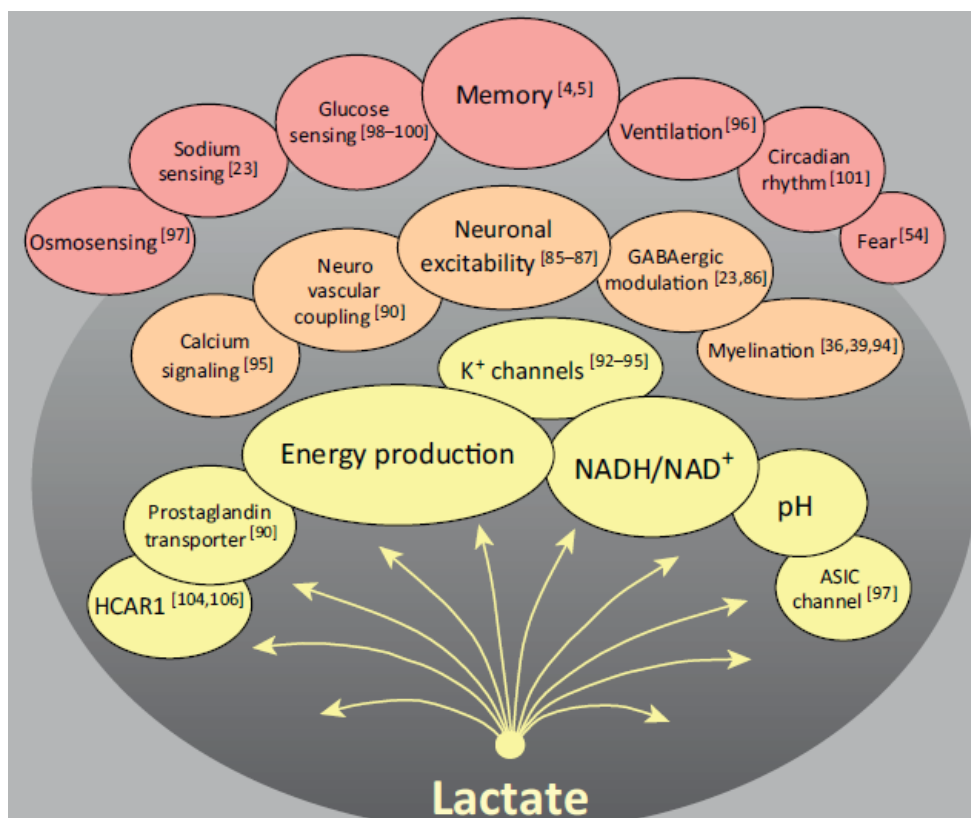


Рисунок 1.4 – Эффекты лактата в ЦНС [L.F.Varros, 2013]

Говоря о роли рецептора GPR81 в головном мозге, необходимо отметить, что путем снижения концентрации цАМФ, лактат способен уменьшать количество сверхактивных сигнальных путей в ЦНС, а значит, влиять на процессы старения [M.Wang et al., 2011]. Помимо этого, через рецепторы GPR81 и PGC-1 α лактат участвует в биогенезе митохондрий [A.Rodell et al., 2013].

Литературе известен пример лактат-опосредованного контроля тонуса артериол в головном мозге. Хотя сам метаболит не оказывает прямого эффекта, он способствует аккумуляции простагландинов (PGE₂), которые и обеспечивают расширение сосудов [G.R.Gordon et al., 2008].

Также отмечено влияние лактата на чувство голода и насыщения путем снижения активности гипоталамической АМФ-киназы и увеличения содержания малонил-КоА, что приводит к снижению выделения ориксигенных субстанций и увеличению содержания аноксигенных нейропептидов, вызывающих чувство сытости [S.H. Cha, M.D. Lane, 2009].

Многогранна роль лактата в качестве посредника и в иммунной системе. Прежде всего, стоит отметить, что лактат выступает как энергетический субстрат как для врожденной, так и для адаптивной иммунных систем [B.Kelly, L.A. O'Neill, 2015]. Помимо этого, дендритные клетки отвечают на стимуляцию лактатом увеличенной секреций противовоспалительного ИЛ-10 и снижают секрецию провоспалительного ИЛ-12 [A.Nasi, B. Rethi, 2013].

Описываемый метаболит способен влиять на гены, кодирующие эффекторные белки моноцитов: цитокины TNF и ИЛ-23 и хемокины CCL2 и CCL7. Лактат вызывает задержку фосфорилирования протеинкиназы B и IκBa. Предположительно, эффекты лактата объясняются вмешательством в передачу сигнала и ее задержкой [K.Peter et al., 2015].

Натуральные киллеры (NK) также чувствительны к введению лактата в их микроокружение. После экспозиции с лактатом содержание перфоринов и гранзима B в них снижалось, что снижало их цитотоксический эффект. Ингибирование синтеза активирующих рецепторов NKp46 свидетельствует о том, что изменения, вызываемые лактатом, затрагивают генный аппарат клетки [Z.Husain et al., 2013].

Лактат, имея совсем небольшую молекулярную массу, оказывает разнонаправленные и множественные влияния не только на метаболизм в целом, но и на системы межклеточного взаимодействия, передачи сигнала, регулирование системы воспалительного ответа и др.

Интересным представляется, используя методы компьютерного моделирования, оценить возможные биологические эффекты исследуемого соединения, поскольку все еще остается достаточное количество вопросов о функционировании, транспорте и межмолекулярном взаимодействии лактата

с различными структурами.

1.2 Увеличенное содержание лактата в крови: причины и следствия

Увеличение уровня лактата в крови во время различных патологических состояний впервые заметили еще в 1800х годах, когда J.Schrerer измерил содержание лактата посмертно у женщины с родильной горячкой. В 1858 году Folwarcny описал увеличенное содержание лактата прижизненно у пациентов с лейкемией, а в 1878 Salomon - у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких, пневмонией, опухолями и сердечной недостаточностью. В последующие десятилетия продолжались эксперименты по изучению роли лактата в различных тканях, а также взаимоотношений пирувата с лактатом при физиологических и патологических состояниях [E.J.Kompanje et al., 2007].

На сегодняшний день известно, что при патологических состояниях продукция лактата происходит в большом количестве тканей, например, в легких, даже при условии, что организм не находится в состоянии гипоксии [D.De Backer et al., 1997]; в лейкоцитах при осуществлении фагоцитоза [N. Borregaard, T Herlin, 1987], также увеличение содержания лактата наблюдается при септических состояниях [B.A. Mizock, 2001].

Избыточное накопление лактата в организме человека получило название лактоацидоз (лактат-ацидоз, лактацидоз), хотя, с нашей точки зрения, более корректно употреблять термин гиперлактатемия, поскольку процесс гликолиза сопряжен с образованием большого количества лактат-анионов, чем молочной кислоты. Протоны же накапливаются вследствие гидролиза молекулы АТФ, что и обуславливает наличие ацидоза [I.Gillespie et al., 2016]. С другой стороны, во время острых гипоксических состояний происходит эквимольное образование ионов H^+ и лактат- для каждого моля лактата [K.Nopper, S.Haskins, 2008].

Под гиперлактатемией будем понимать концентрацию лактата в плазме крови более 5 ммоль/л, сопровождающуюся снижением рН до 7,35 и

концентрацией бикарбонатов $[\text{HCO}_3^-]$ 20 ммоль/л и ниже [J.P. Ruiz, 2011; J.A. Kraut, N.E. Madias, 2014]

Следует отметить, что лактат как метаболит является безвредным для органов и тканей, а его повышение не является причиной усугубления и развития патологических состояний, а скорее служит острым маркером имеющихся нарушений.

Woods и Cohen предложили классификацию состояний, сопровождающихся гиперлактатемией [H.F. Woods, R. Cohen, 1976]. При этом они выделили две большие группы причин: тип А ассоциирован с недостаточной перфузией органов и тканей кислородом, тип В имеет под собой основу в виде заболевания, применения некоторых лекарственных средств или проявляется вследствие болезней метаболизма.

Гиперлактатемия типа А возникает в том случае, когда потребность клеток и тканей в кислороде не может быть удовлетворена посредством имеющегося уровня обмена веществ. При таком состоянии увеличивается активность протекания гликолитических процессов, которые приводят к накоплению пирувата. В условиях низкого напряжения кислорода, пируват и протоны не могут быть транспортированы через мембрану митохондрии, чтобы вступить в процессы окислительного фосфорилирования, что приводит к истощению запасов НАД⁺. При образовании лактата происходит потребление пирувата и протонов, что является защитной мерой и смягчает явления ацидоза [G.A. Brooks, 2010]. А также происходит восполнение НАД⁺, что помогает временно удовлетворить нужды энергетического обмена.

Также в условиях гипоксии происходит ингибирование пируватдегидрогеназы, блокируется путь превращения пирувата в ацетил-СоА и невозможным становится его вступление в цикл трикарбоновых кислот. Кроме того, известно, что во время гипоксических состояний угнетается фермент пируваткарбоксилаза, катализирующий превращение пирувата в оксалоацетат на пути глюконеогенеза [T.C.Vary, 1998].

При невозможности направиться ни по одному из вышеназванных путей пируват под действием лактатдегидрогеназы превращается в лактат. Внутриклеточная концентрация лактата нарастает стремительно, соотношение лактат:пируват достигает 40:1 [J. Bakker et al., 2013].

Происходящее изменение значений pH в сторону его уменьшения приводят к ряду системных нарушений в организме. Например, в сердечной мышце изменяется проницаемость Ca-каналов, ухудшается способность связывания ионов Ca с тропонином [M.J.Ming et al., 2000].

Кроме этого, происходит активация процессов апоптоза клеток: увеличивается экспрессия гена BNP3 и содержание этого белка в цитоплазме. Также он накапливается в мембране митохондрии, приводя к образованию пор, через которые происходит выделение факторов апоптоза (цитохром C и др.), это стимулирует ядерную транслокацию дезоксирибонуклеазы без активации каспазы, что приводит к клеточной смерти [B.Jiang et al., 2010].

Однако, не стоит относиться к гиперлактатемии исключительно как к состоянию, сопровождающему или вызывающему определенные патологические ответные реакции организма. Известны примеры протективного воздействия повышенной концентрации лактата на клетки и органы: в эксперименте во время реперфузии миокарда после ишемических состояний сохранение состояния ацидоза способствовало уменьшению проявлений постишемических повреждений кардиомиоцитов, также увеличенное содержание лактата уменьшало активацию нейтрофилов и образование свободных радикалов, а выделение оксида азота и аденозина, напротив, возрастало, поддерживая и защищая от ишемической травмы [A.Kimmoun et al., 2015].

Работа мышечных волокон сопряжена с потреблением и выделением лактата, при этом выделение лактата происходит на протяжении всего времени работы мышцы. Интересно, что после мало- и среднеинтенсивных тренировок уровень лактата плазмы остается неизменным, повышаясь только

при высокоинтенсивной тренировке. Таким образом, можно говорить о лактате как о маркере выносливости. Вызванная тренировкой гиперлактатемия ликвидируется за счет потребления лактата другими тканями: головной мозг переходит с базового уровня потребления лактата до исключительного употребления данного метаболита; мышцы, не принимавшие участия в данной физической активности также переходят на повышенное потребление лактата; клетки миокарда и кишечника участвуют в возвращении концентрации лактата до показателей нормолактатемии. Отмечено, что чем более тренирован спортсмен, тем меньше повышается уровень лактата в крови после тренировки, что вероятно, может быть связано с более совершенными процессами окислительного фосфорилирования [M.Adeva-Andany et al., 2014]. Напротив, если же до начала упражнений имеется очаг хронической ишемии (анемия, хроническая сердечная недостаточность) уровень лактата нарастает более быстро и более сложно поддается коррекции [Overgaard et al., 2012].

Утомление сердечной мышцы, часто встречающееся в спорте высоких достижений, частично связывают с явлением гиперлактатемии, которая запускает катаболизм пуринов, увеличивает процессы перекисного окисления липидов и снижает антиоксидантную защиту организма [В.В.Корнякова, 2011].

Интересно, что способность эритроцитов сохранять эластичность мембраны в условиях увеличенной концентрации лактата зависит от возраста организма: эритроциты молодых и юных организмов устойчивы к концентрациям лактата до 20 ммоль/л, в то время как эритроциты более старших организмов становятся ригидными под воздействием гиперлактатемии и теряют способность к выполнению своих функций [А.Д.Жемела, 2013].

Дефицит тиамин также может являться причиной развития лактоацидоза, что особенно характерно для пациентов в критическом состоянии. Запасы тиамин в организме лимитированы, расход же данного

витамина высок в виду выполнения им коферментных функций, поэтому быстрое истощение данного вещества может приводить к неблагоприятным последствиям. Неукротимая рвота, прием больших дозировок петлевых диуретиков, нарушение питания – все это может являться причинами тиаминдефицита [D.A.Sica, 2007]. В условиях этого состояния снижается интенсивность окислительного декарбоксилирования пирувата, что делает невозможным его вступление в цикл Кребса, это сопровождается накоплением промежуточных метаболитов, в том числе лактата, а также снижает внутриклеточное образование молекул АТФ [В.В.Ломиворотов и соавт., 2017].

Интересным представляется изменения в функциональной активности такого органа как селезенка в ответ на явления лактоацидоза. Снижение рН крови приводит к компенсаторному сокращению селезенки с целью коррекции метаболических нарушений, дальнейшее нарастание явлений ацидоза приводит к снижению количества лимфатических фолликулов, а на субклеточном уровне приводит к нарушению проницаемости цитоплазматической мембраны, деструкции ядра, а также повреждению других органоидов с выходом их во внутриклеточный матрикс [Е.В.Альфонсова, Н.В.Бочкарникова, 2011].

Система гемостаза реагирует на увеличенное содержание лактата следующим образом: при сдвиге рН до 7,2 отмечается склонность тромбоцитов и эритроцитов к агрегации, возникают явления гиперкоагуляции, при рН 7,1-7,0 возникает коагулопатия потребления, сменяющаяся афибриногемией [Е.В.Альфонсова, 2016].

Опухолевое микроокружение представляет собой сложную динамическую клеточную среду, включающая в себя опухолевые клетки, стромальные клетки, кровеносные сосуды, факторы роста и метаболиты [M.Egeblad et al., 2010]. Постоянный обмен метаболитами между опухолевыми клетками перепрограммирует микроокружение опухоли и помогают им удовлетворять свои высокие метаболические потребности и

влиять на общий рост опухоли [C.A.Lyssiotis, A.C.Kimmelman, 2017]. Характерной особенностью микроокружения опухоли является нарушение регуляции метаболических свойств [D.Mishra, D.Banerjee, 2019]. Такие клетки устанавливают усиление метаболических взаимодействий, используя способы получения питательных веществ за счет дифференциального поглощения глюкозы и аминокислот [N.N.Pavlova, C.B.Thompson, 2016], а также за счет биосинтеза липидов, белков и нуклеиновых кислот [J.Swierczynski et al., 2014].

Лактатдегидрогеназа является одним из ключевых метаболических ферментов, составляющих микроокружение опухоли, превращая пируват в лактат и наоборот. Ранее сообщалось о снижении уровня ЛДГ при множественных опухолях, включая рак поджелудочной железы [B.Schlichtholz et al., 2005], рак молочной железы [A.Kurpanska et al., 2019], рак носоглотки [Y.Su et al., 2017], рак желудка [W.Jiang et al., 2015], рак мочевого пузыря и рак эндометрия [A. Giatromanolaki et al., 2006].

Исследования *in silico* и *in vitro*, проведенные в последние несколько лет, выявили, что LDHA и LDHB могут являться потенциальными мишенями терапевтических взаимодействий. Обнадеживает выявление селективных низкомолекулярных ингибиторов ЛДГ для таргетной терапии опухолей [R.Rani, V.Kumar, 2016], и их совместное использование с ингибиторами специфических метаболических путей поможет расширить клиническую применимость [A.Boudreau et al., 2016]. Для разработки низкомолекулярных ингибиторов используются различные подходы *in silico* рентгеновская кристаллография [R.A.Ward et al., 2012], молекулярная динамика (MD) и моделирование [Y.Shi, B.M.Pinto, 2014; R.Sun et al., 2015], подход на основе рецепторов фармакофорного моделирования [T.Tuccinardi et al., 2016], структурный виртуальный скрининг [R. Buonfiglio et al., 2013]. Доклинические исследования *in vitro*, проведенные с использованием низкомолекулярных ингибиторов как природного, так и синтетического происхождения, показали потенциал блокирования экспрессии ЛДГ (рисуное

1.5). При изучении метаболизма опухолевых тканей было отмечено, что в 70% этих клеток наблюдается гиперэкспрессия генов гликолиза. Известно, что гликолитический путь расщепления глюкозы является для клеток новообразований более приемлемым по сравнению с циклом трикарбоновых кислот и окислительным фосфорилированием. В виду того, что гликолиз завершается образованием всего 2 молекул АТФ, клеткам требуется многократное повторение этого цикла, чтобы удовлетворять энергетические потребности, что сопровождается выделением лактата из клетки с целью поддержания внутриклеточного гомеостаза [B.Jiang, 2017].

Стоит отметить, что использование гликолиза как основного процесса получения энергии не означает блокировку окислительного фосфорилирования и цикла трикарбоновых кислот в опухолевых клетках. По данным последних исследований, функция митохондрий полностью сохранна в клетках новообразований [D.A. Scott et al., 2011].

Увеличенное образование лактата внутри клетки ставит новые задачи транспортным системам, посредством которых происходит выведение излишков этого метаболита во внеклеточное пространство: увеличивается экспрессия транспортеров МСТ, особенно 1 и 4 типов [A.P.Andersen et al., 2016], которые и способствуют быстрому выведению лактата из цитоплазмы.

Высокая интенсивность гликолиза в опухолевых клетках приводит к снижению содержания НАД⁺ и образованию лактата. Посредством онкогенной активации опухолевых супрессорных мутаций и эпигенетических механизмов опухолевые клетки подвергаются метаболическому перепрограммированию в высокогликолитические и слабоокислительные клетки [A.J.Levine, A.M.Puzio-Kuter, 2010; L.Ippolito et al., 2018].

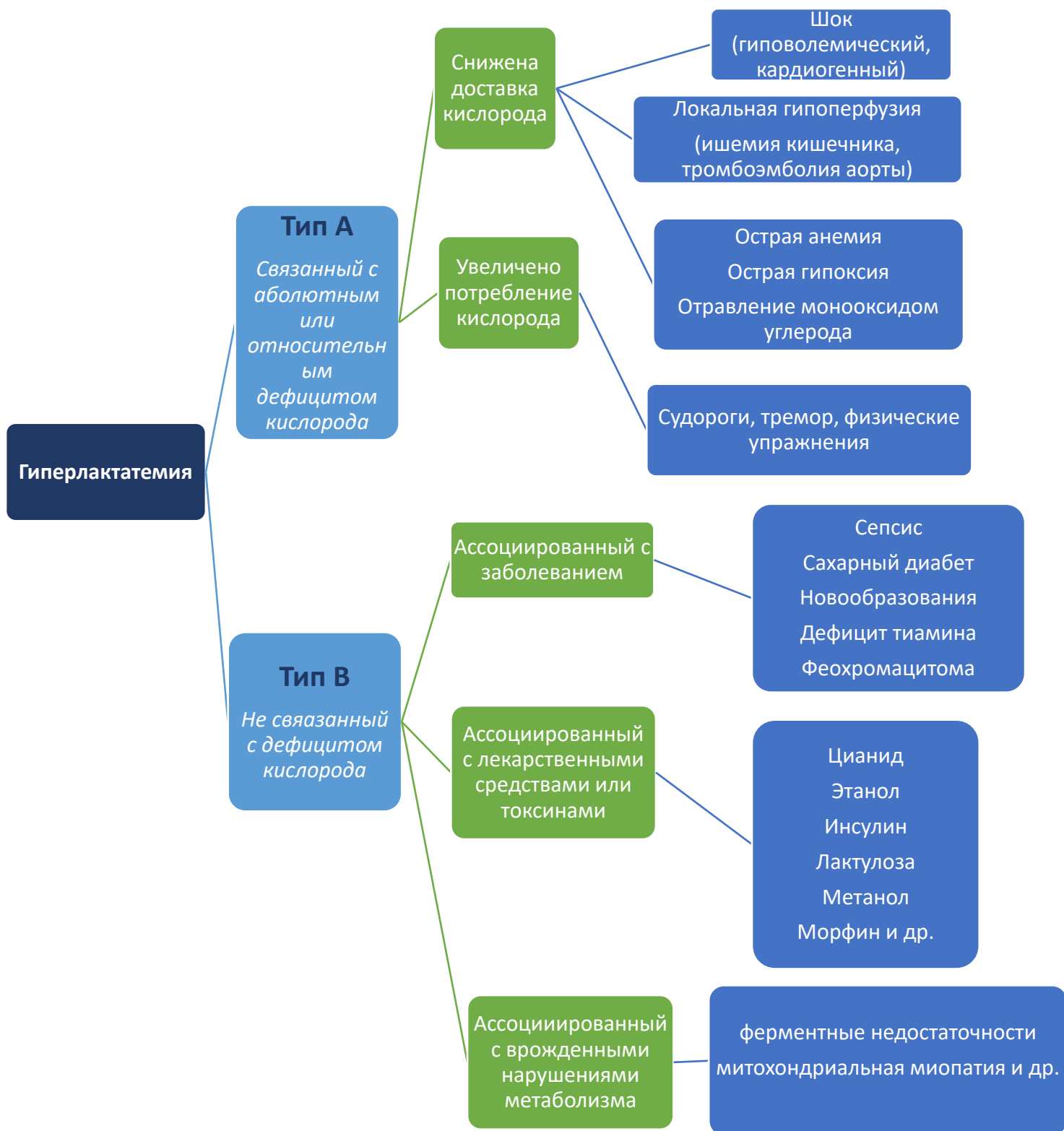


Рисунок 1.5 – Состояния, сопровождающиеся гиперлактатемией [по H.F. Woods, R. Cohen, 1976]

Повышенное потребление глюкозы клетками опухоли по пути гликолиза поддерживается гликогенолизом лишь частично из-за истощения запасов гликогена. Для обеспечения адекватного снабжения глюкозой эти клетки используют активно глюконеогенез, а также протеолиз и глутаминолиз, что служит источником цитозольного пирувата для дальнейшего образования лактата [I.San-Millan, G.A.Brooks, 2017]. Поскольку скелетная мышца является одним из основных источников глутамин, абберантная мобилизация глутамин из соседних с опухолями мышечных клеток также может объяснить кахексию у больных раком.

Биосинтез лактата опухолевыми клетками происходит в основном за счет дисрегуляции триады транскрипционных факторов: HIF-1, c-Myc и p53 [S.J.Yeung et al, 2008]. Помимо низкого кислородного напряжения, псевдогипоксические условия, ведущие к стабилизации HIF-1 и эффекту Варбурга, включают стимуляцию факторов роста и стрессовую реакцию [G.L.Semenza, 2010]. Подавление активности p53 приводит к усиленной транскрипции генов, кодирующих гликолитические ферменты, МСТ и лактатдегидрогеназу А [C.V.Dang et al., 2009].

Макрофаги M1 увеличивают потребление глюкозы и выделение лактата, снижают потребление кислорода, макрофаги M2 в основном используют окислительный метаболизм глюкозы [S.K.Biswas, 2015]. M1 макрофаги активируют опухолевые факторы, что приводит к увеличению гликолитического потока и нарушению активности цикла Кребса, вызывая накопление сукцината и поддерживая траекторию Akt/HIF-1.

Среди различных популяций Т-клеток, вовлеченных в иммунный ответ хозяина во время прогрессии опухоли, метаболическое перепрограммирование эффекторных Т-клеток приводит к сдвигу в сторону аэробного гликолиза, с регуляцией биосинтеза лактата, фосфатного пути карантозы и глутаминолиза [L.Esteban-Martinez et al., 2015]. CD4+ Th1 и Th17 лимфоциты подвергаются анаболическому метаболическому перепрограммированию, которое приводит к накоплению гликолитических

промежуточных продуктов, поддерживающих их быстрое распространение. Этот процесс зависит от HIF-1, контролирует сверхэкспрессию G1F-1 и ЛДГА и коррелирует со снижением рН в микроокружении опухоли.

Разумно предположить, что лактат помещен в этот сценарий как взаимозаменяемая молекула между клетками, и не только в качестве простого гликолитического побочного продукта. Сообщается, что раковые клетки, способные к окислительному фосфорилированию, расположенные вблизи кровеносных сосудов, могут создавать метаболический симбиоз с клетками, использующий анаэробный гликолиз, что является существенным для прогрессирования быстрорастущей опухоли в условиях гипоксии. Клетки опухоли, способные к окислительным процессам, переходят на окислительный метаболизм на основе лактата, выделяемого клетками анаэробной зоны через МСТ4, экспрессия которого напрямую контролируется гипоксией, а через МСТ1 - насыщенными кислородом опухолями [P.Sonveaux et al., 2008]. Важно отметить, что метаболический симбиоз «анаэробных» клеток, экспрессирующих МСТ4, и экспрессирующих оксигенированные клетки МСТ1, стимулирует устойчивость к антиангиогенной терапии на мышах и при исследовании на человеке, в которых ингибирование пути mTOR представляет собой избирательный способ уничтожения периваскулярной субпопуляции МСТ1, устойчивой к антиангиогенным ингибиторам [E.Allen et al., 2016]. И наоборот, устойчивость к ингибиторам PI3K/mTOR возникает в раковых клетках молочной железы, активно участвующих в окислении лактата - метаболическом адаптивном пути, принятом для противостояния колебаниям в наличии глюкозы [S.Park et al., 2016].

Интересно, что проведенное в эксперименте ингибирование МСТ1 посредством введения лонидамина полностью останавливало рост опухолевых клеток, поскольку невозможным становился транспорт лактата за пределы цитозоля [P.Sonveaux et al., 2012].

Кроме этого, лактат оказывает активирующее воздействие на экспрессию сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), трансформированного фактора роста бета (TGF beta) и интерлейкина 1 даже в клетках тех опухолей, где цикл Кребса и окислительное фосфорилирование являлись основным источником энергии [V.V.Kumar et al., 2007].

Активация этих факторов приводит к образованию порочного круга: лактат стимулирует экспрессию VEGF, что усиливает ангиогенез; процессы ангиогенеза требуют увеличенных энергетических затрат, что приводит к усилению нагрузки на гликолитические процессы и избыточному образованию лактата, который в свою очередь стимулирует к экспрессии ряд биологически активных субстанций. Более того, опухолевые клетки, расположенные вокруг сосудов даже при наличии большого количества глюкозы, используют лактат в качестве предпочитаемого субстрата для энергетических процессов.

Существует мнение, согласно которому, опухолевые клетки намеренно эндогенно производят пероксид водорода, чтобы создать псевдогипоксические условия, в которых происходит активация гликолиза и увеличение экспрессии монокарбоксилатных транспортеров [B.Jiang, 2017].

Гиперлактатемия, составляющая основу микроокружения опухолевых клеток, ингибирует выделение лактата из T-клеток, для которых гликолиз также является основным путем получения энергии, что приводит к снижению их цитокин продуцирующей активности на 95% [K.Fischer et al., 2007].

Имеются данные, свидетельствующие о стимулирующем влиянии повышенных концентраций лактата на фермент аденозиндезаминазу, которая играет ключевую роль в обмене пуринов. Также этот фермент служит для определения активности клеток лимфоцитарной системы. При опухолевых процессах наблюдается снижение активности аденозиндезаминазы в лимфоцитах и ее увеличение в сыворотке крови [О.П.Шатова и соавт., 2009].

При септических состояниях и геморрагическом шоке наблюдается выброс катехоламинов, в частности, эпинефрина, который посредством β_2 -адренергической стимуляции может приводить к гиперлактатемии. Стимулирование названных рецепторов приводит к увеличению содержания цАМФ, что в свою очередь активирует гликогенолиз и усиливает аэробный гликолиз, продукцию АТФ и активацию Na^+/K^+ -АТФазных каналов. Данные каналы потребляют энергию АТФ, что вновь приводит к реактивации гликолиза и завершается избыточным образованием пирувата, часть из которого переходит в лактат [В. Levy et al., 2008].

Увеличенное содержание лактата может также встречаться при сахарном диабете первого и второго типов, особенно на фоне имеющейся алкогольной зависимости. Это состояние возникает вследствие голодания при сниженных запасах гликогена, пониженной секреции инсулина, повышенной секреции контринсулярных гормонов и дегидратации. Гормональные изменения, в особенности, увеличение содержания глюкагона приводит к усилению липолиза, мобилизации жирных кислот и накоплению кетоновых тел. При этом под действием этанола происходит ингибирование превращения лактата в пируват в пользу синтеза β -гидроксибутирата, что и приводит к гиперлактатемии [J. Krzymień, W. Karnafel, 2013]. Отмечено, что к явлению лактатацидоза более склонны представители европеоидной расы [Л.И. Колесникова и соавт., 2016].

Сдвиг соотношения лактат/пируват в сторону образования лактата также наблюдается при таких заболеваниях, как хронический дуоденит и муковисцидоз, что объясняется преобладанием процессов анаэробного гликолиза над реакциями аэробного обмена [О.В. Кондратьева и соавт., 2012].

Отравление метанолом также может приводить к увеличенному содержанию лактата. Образующийся избыток НАДН в печени во время метаболизма метанола алкогольдегидрогеназой приводит к увеличению лактата, кроме того, синтезированная муравьиная кислота ингибирует окислительное фосфорилирование в митохондриях [Erker, Bakker, 2010].

Рассматривая другие причины возникновения данного состояния, стоит обратить внимание на применение некоторых лекарственных средств, например, метформина.

Метформин увеличивает чувствительность тканей к инсулину главным образом за счет снижения глюконеогенеза в печени и угнетения процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях. Именно за счет угнетения процесса глюконеогенеза, одним из основных субстратов которого является лактат, а также за счет изменения редокс-потенциала митохондрий в некоторых случаях терапия данным лекарственным средством может приводить к явлению гиперлактатемии [L.S.Weisberg, 2015].

Среди причин, приводящих к гиперлактатемии, отдельно стоят ферментные недостаточности и нарушение работы митохондрий.

Врожденная недостаточность пируватдегидрогеназного комплекса связана с мутацией в гене PDHA1, который расположен на двадцать второй хромосоме и кодирует E1 α субъединицу [Steller et al., 2014]. Приобретенная функциональная недостаточность данного фермента возможна в связи с голоданием, дефицитом тиамина, поскольку данный фермент использует его в качестве кофермента [Naito et al., 1994]. В результате дефицита описываемого компонента снижается образование ацетил-СoА из пирувата, следовательно, окисление пирувата в цикле трикарбоновых кислот снижается, как и общая способность клетки использовать цепь переноса электронов для получения АТФ. Названные изменения приводят к накоплению лактата в клетке. [Patel et al., 2012].

Еще одной врожденной причиной развития гиперлактатемии является нарушение функционирования цикла трикарбоновых кислот, например, врожденная недостаточность α -кетоглутаратдегидрогеназы, которая катализирует декарбоксилирование α -кетоглутарата в сукцинил-КоА. Данный фермент состоит из трех субъединиц, недостаточность E3 единицы, которая является общей с пируватдегидрогеназным комплексом приводит к возникновению увеличенного содержания лактата в крови вместе с

увеличенным уровнем аминокислот [S.C. Quinonez et al., 2013]. Также подобное состояние может возникнуть при дефиците сукцинил-КоА-синтетазы вследствие мутации в гене SULCG1 [J.L. Van Hove et al., 2010].

К схожим последствиям может привести поступление экзогенной фруктозы, в случае если наблюдается недостаточность ферментов альдолазы В, субстратом которой могут являться фруктозо-1-фосфат и фруктозо-1,6-бисфосфат [N. Bouteldja, D.J. Timson, 2010] или фермента фруктозо-1,6-бисфосфатазы. Во втором случае мутация происходит в гене FBP1, данное заболевание является редким и носит аутосомный характер наследования [S. Moon et al., 2011]. Недавно в России был описан первый генетически подтвержденный случай данной болезни у пациента 10 лет [Ю.В.Тихонович и соавт., 2015].

Любые мутации, возникающие в ДНК митохондрий, также опасны развитием состояний, сопровождающихся гиперлактатемией, поскольку может быть затронут синтез белков, входящих в дыхательную цепь, что приводит к возрастающей нагрузке на гликолитический путь получения энергии [D.M.Sproule, P.Kaufman, 2008].

Одним из проявлений митохондриальных мутаций является MELAS-синдром - митохондриальная энцефалопатия с инсультоподобными эпизодами и лактоацидозом, которая сопровождается полиморфной симптоматикой – явления диабета, судороги, инсульта. Патогенез, лежащий в основе данного заболевания, остается малоизученным [М.А.Ямин и соавт., 2017]

Редким, однако существующим явлением, можно считать случаи D-гиперлактатемии. Как правило, такие состояния связаны с избыточным бактериальным ростом в кишечнике. По сравнению с L-лактатом, его оптический изомер является токсическим для головного мозга вещества, поэтому клиническая картина D-гиперлактатемии имеет яркие неврологические проявления [J.Uribarri et al., 1998].

Кроме того, в настоящее время предлагается использовать определение D-лактата как маркера дисбиоза в системе микробиоценоза влагалища [Д.М.Семенов, 2016]. Также D-лактат может быть использован в качестве раннего маркера бактериальных артритов и синовитов при протезировании суставов [С.Д.Карбышева и др.]. Выбор данного метаболита обусловлен тем, что в человеческом организме преобладает левовращающий изомер.

Представленная информация объясняет использование лактата как маркера неблагополучия и оценки общего состояния пациента в клинической практике. На основе систематического обзора, проведенного в 2016 году и включающего 96 проведенных исследований, было установлено, что отсутствие снижения уровня лактата при острых состояниях на 10-20% в течение двух часов ассоциировано с неблагоприятным клиническим прогнозом [J.-L. Vincent et al., 2016]. Наличие гиперлактатемии также считается усугубляющим фактором при онкологических заболеваниях [J.Held-Warmkessel, D.D. Dell, 2014].

Все большее распространение получает лактат амниотической жидкости как маркер внутриутробной гипоксии. Считается, что увеличенное содержание лактата имеет большую прогностическую ценность, чем рН и часто служит предиктором низкой оценки новорожденного по шкале Апгар [T.Y. Su et al., 2013]. Отмечено, что содержание лактата амниотической жидкости мало коррелирует с лактатом пуповинной крови, однако, использование соотношения лактат/креатинин имеет высокую корреляционную связь [Ю.В.Кореновский и соавт., 2013].

Мало известно о влиянии пониженного содержания лактата на процессы, протекающие в организме. Обнаружена взаимосвязь между низким уровнем лактата плазмы и склонностью к набору веса у пациентов, страдающих сахарным диабетом 2 типа, объясняющуюся тем, что головной мозг не может использовать в этом случае лактат как резервное топливо, а значит, более продолжительное время пребывает в относительном состоянии

голода и нуждается в экзогенном поступлении питательных субстратов [R.I. van Dyken et al., 2010].

При исследовании функции Т-клеток у пациентов, страдающих хронической обструктивной болезнью легких и бронхиальной астмой, было отмечено, что низкое содержание лактата стимулирует функцию Т-клеток, в то время как высокое – угнетает. Отметим, что уровень лактата плазмы у пациентов с данной патологией несколько превышает нормальные значения, однако, не превышает границы лактоацидоза [M.Ostroukhova et al., 2012].

Таким образом, мы видим, что многие состояния, обладая совершенно разными путями патогенеза, сходятся в одной общей точке – гиперлактатемии, которая с одной стороны является сигналом о катастрофе, происходящей в организме, с другой стороны – способна выполнять некоторые протекторные функции. Почему в качестве метаболита первой линии природой был выбран именно лактат еще оставляет много вопросов, однако, очевидно, что дальнейшее изучение этого интермедиата при физиологических и патологических состояниях способно выявить важные и еще не изученные механизмы регуляции различных процессов и поддержания внутри- и внеклеточного гомеостаза.

1.3 Возможности компьютерного моделирования в определении биологического потенциала низкомолекулярных лигандов

Благодаря высоким достижениям в области науки и техники, а также в связи с компьютеризацией научных лабораторий, сегодня сложно представить себе отрасль научного знания, в которой мы бы могли обойтись без прикладных программ. Если раньше компьютер использовался как средство для проведения статистической обработки полученных *in vitro* или *in vivo* результатов экспериментов, то современные программы позволяют произвести весь эксперимент, используя лишь компьютер. Новое направление проведения экспериментов получило название *in silico* и менее, чем за тридцать лет своего существования [H.B.Sieburg,1990] стало

незаменимым инструментом в исследованиях.

Необходимость развития этой отрасли была связана с тем, что рентгеноструктурный анализ и ядерная магнитная томография могли представить лишь «портрет» молекулы в конкретный момент времени, но не давали ответа на вопрос о том, как происходит движение молекул, что именно стоит за понятием «конформационная перестройка», как движутся и взаимодействуют друг с другом атомы (рисунок 1.6).



Рисунок 1.6 – Предпосылки развития молекулярного моделирования

Молекулярное моделирование является частью более широкого понятия *in silico* и дает возможность на уровне атомов изучать молекулярные системы любой сложности. Имеющиеся программы компьютерного моделирования условно можно разделить на две большие группы. Первая группа предназначена для решения вопросов движения и взаимодействия атомов в молекуле (молекулярная механика, молекулярная динамика), вторая – для визуализации полученных взаимодействий. Несколько отдельно, но имея в основе отмеченные элементы, находятся программы, которые моделируют биологическую активность, основываясь на химических и физических свойствах. Третье десятилетие XXI века можно назвать эпохой расцвета молекулярного моделирования. Современным суперкомпьютерам под силу представить молекулу, содержащую более, чем 1000000 атомов, имеющую

длину траектории свыше 100000 нс (рисунок 1.7).

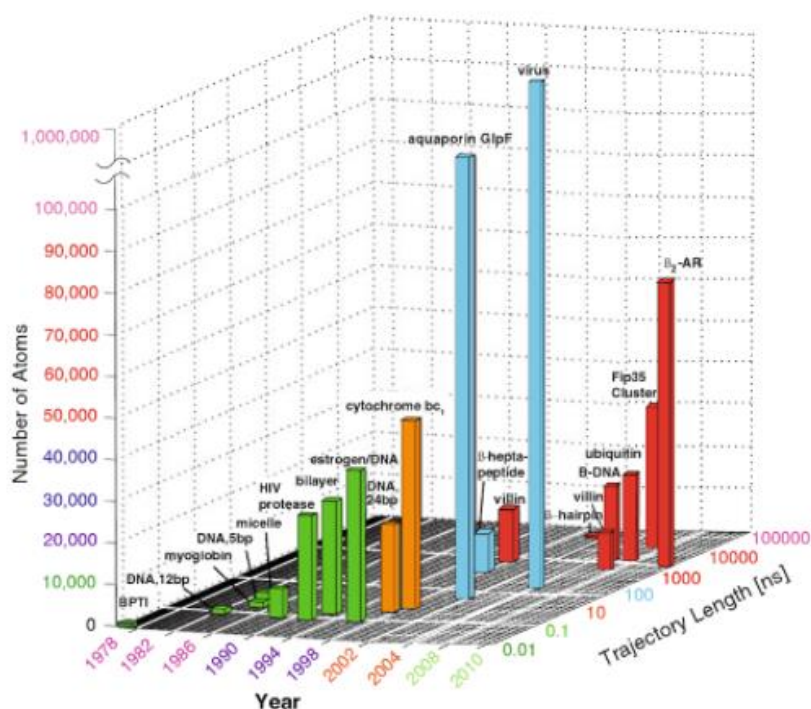


Рисунок 1.7 – Прогресс молекулярного моделирования. На графике отображено изменение количества атомов и длины молекулы, доступных моделированию, в период с 1978 по 2010 годы [по T. Schlick, 2010]

В свободном доступе для любого исследователя существует также большая и постоянно пополняющаяся открытая база данных белков, в которой хранятся 3D структуры известных науке спродуммированных структур (<http://www.rcsb.org/>). По данным на 2011 год, в библиотеке содержалось более, чем 77 000 образцов. В связи с тем, что ресурс является открытым и как внесение, так и удаление авторских работ происходит ежедневно, точный подсчет находящихся там на данный момент структур затруднен. Однако, тенденция к увеличению и повсеместному использованию прикладных программ очевидна [A.Kriete et al., 2014; P.Christen, 2018].

Сегодня существует большой арсенал технических возможностей, позволяющих с различных сторон провести компьютерное моделирование, приведем некоторые из них (рисунок 1.8).

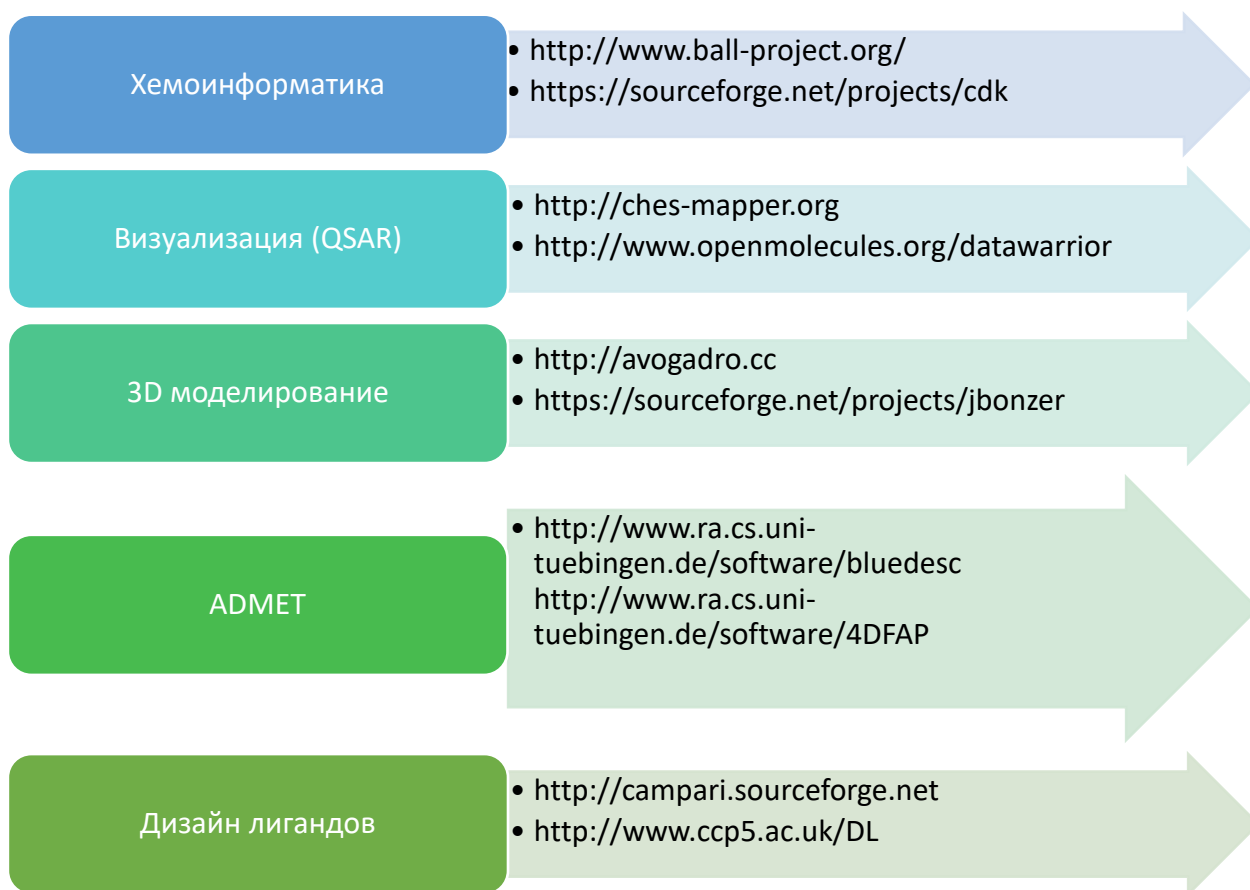


Рисунок 1.8 – Программы для молекулярного моделирования на платформе с открытым кодом [по S.Pirhadi et al., 2016]

Хемоинформатика объединяет процессы представления и моделирования молекулярных данных. Программы в этой области могут быть автономными ресурсами, но чаще представляют собой библиотеки, используемые другими более сложными программами. Например, объектно-ориентированная библиотека биохимических алгоритмов (BALL), написанная на языке программирования C ++, используется для нужд структурной биоинформатики. Возможности этой программы позволяют производить моделирование процессов молекулярной механики, подсчитывать количество лигандов, а также имеется возможность интегрировать данные с программой QSAR [A.Hildebrandt et al., 2010].

CDK также программа, относящаяся к области хемоинформатики, написанная на языке Java. Она позволяет определять дескрипторы и

производить расчеты силового поля, поиск молекулярных подструктур и моделирование цельной структуры [C. Steinbeck et al., 2006].

Значимым звеном любого процесса моделирования является возможность визуализировать полученные результаты. Программное обеспечение для этих целей включает 2D и 3D утилиты. Стоит отметить, что при моделировании *in silico* предпочтение отдается программам, на основе QSAR, поскольку применяемый метод оперирует большим количеством различных дескрипторов (фрагментные, физико-химические и квантово-химические, дескрипторы молекулярных полей, топологические индексы и др.) и обладает наивысшей точностью, о чем свидетельствует большое количество экспериментов, выполненных с применением данной программы [B.Chen et al., 2015; K. Nikolic et al., 2016].

Группа программ типа Avogadro [M.D. Hanwell et al., 2012] представляет собой трехмерный молекулярный просмотрщик с функцией редактирования и интерактивной оптимизацией для внесения изменений в режиме реального времени.

Отличительной особенностью представленных программ является то, что все они функционируют на платформе open access (открытый доступ) и являются бесплатными для любого исследователя.

В виду большого количества программ и экспериментов, постоянно совершающихся в сфере компьютерного моделирования, особую значимость приобретают электронные справочники, помогающие расшифровать данные и выбрать из них ценные для практики. Одним из таких ресурсов является база данных KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Она интегрирует 15 библиотек, содержащих информацию о системах (метаболические пути, функциональная иерархия), геноме (каталог расшифрованных геномов), лигандах (метаболиты и малые молекулы, гликаны, биохимические реакции, ферменты) и информацию о здоровье (болезни, лекарственные средства). На основе хранящихся данных моделируются карты метаболизма, отличающиеся особенной подробностью.

Основная цель этих карт – не пропустить ни одной взаимосвязи, ни одной промежуточной реакции, раскрыть все многообразие биохимических превращений в клетке живого организма. Поэтому метаболические карты постоянно обновляются, включают в себя новые и проверенные знания [M.Kanehisa et al., 2014].

Другой современной библиотекой является BioGRID (<https://thebiogrid.org>), которая хранит данные о белок-белковых, генетических и химических взаимодействиях различных структур. По данным за 2017 год, в ней насчитываются 1072173 различных взаимодействия, 38559 посттрансляционных перестроек, упоминание этой базы отмечено в 48114 публикациях. За год число известных взаимодействий увеличилось на 30% [A.Chatr-Aryamontri et al., 2017]. Интересно отметить, что с течением времени взаимодействия типа белок-белок, белок-ДНК отходят на второй план, уступая место другим взаимодействиям (субстрат-фермент, лиганд-рецептор и др.), что лишь подчеркивает актуальность исследования роли малых молекул и интермедиатов в качестве молекулярных зондов (рисунок 1.9).

Малые молекулы, под которыми здесь и далее мы будем понимать соединения органической природы с молекулярной массой от 40 до 1000 Да, интересны для исследователей по многим причинам, среди них - возможность новых фармацевтических разработок [X.Xu et al., 2016]. Вместе с тем, большое количество малых молекул являются эндогенными лигандами – соединениями, которые составляют внутриклеточное и межклеточное окружения нашего организма. Кроме того, говоря о малых молекулах нельзя забывать и о соединениях, находящихся в окружающей среде, которые попадают в наш организм в процессе дыхания, приема пищи – составляя экзогенный пул низкомолекулярных лигандов.

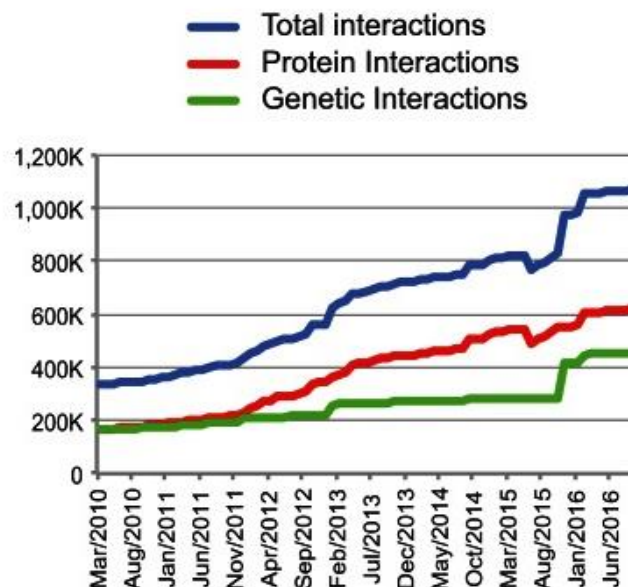


Рисунок 1.9 – Динамика изменения количества данных в библиотеке BioGRID о белок-белковых, межгеномных и других взаимодействиях с 2010 по 2016 годы [по A.Chatr-Aryamontri et al., 2017]

1.3.1. Возможности моделирования биологической активности низкомолекулярных лигандов

Компьютерное моделирование сегодня неразрывно связано с такой областью знаний как хемогеномика, занимающейся разработкой возможности влияния на конкретные мишени (ферменты, гормоны, рецепторы) путем исследования структуры и активности лигандов этих мишеней. Хемогеномика опирается на постулаты химической генетики, которая исследует функции белков и путей передачи сигналов в клетках методом скрининга химических библиотек малых молекул и химической геномики, которая исследует потенциальные точки приложения малых молекул с фармакологической точки зрения [A.Bender et al., 2007]. Если в подходах к хемогеномике особое внимание уделяется неотъемлемым взаимосвязям между мишенями, то в подходах к химической генетике влиянию самой малой молекулы в биологической системе (по аналогии со стандартными генетическими методами, такими как "нокаут" генов) [A.Schuffenhauer et al., 2003]. Информация о малых молекулах и их

потенциальной биоактивности сегодня является открытой и содержится в электронном формате, также доступной стала возможность обрабатывать эту информацию с применением персональных компьютеров в режиме реального времени. Эти достижения способствуют извлечению и анализу информации в беспрецедентных масштабах. Например, сегодня возможно не просто смоделировать химическое соединение с агонистической/антагонистической активности по отношению к выбранному рецептору или белку, а проанализировать все известные химические соединения, которые взаимодействуют со всеми существующим рецепторами такого рода и на основании этого сделать прогноз, который будет отличаться высокой точностью [M.J.Keiser et al., 2003].

Для описания взаимодействия малых молекул и их мишеней во многом справедлива концепция «ключ-замок», однако, это ставит перед исследователем вопрос о том, к каким именно «замкам» мы подбираем «ключи» [A.Bender et al.,2007]. Например, некоторые широко известные лекарственные средства, давно вышедшие на рынок, использовались во многом эмпирически, поскольку не было произведено полной оценки возможных мишеней взаимодействий лекарственного соединения [M. Lotfi Shahreza et al., 2018]. Сегодня эта концепция активно развивается, вследствие чего появился такой термин как «репозиционирование» лекарственных средств. Возможности полномасштабного исследования потенциальных точек приложения исследуемых соединений способствовали расширению случаев их применения, а иногда и полностью перепрофилировали назначение препарата [H.Xue et al., 2018].

Классические подходы к прогнозированию мишеней малых молекул можно разделить на четыре класса: поиск химического сходства, получение данных методом машинного обучения, докинг и анализ спектров биоактивности [A.Bender et al., 2007]. При поиске химического сходства происходит сравнение изучаемой структуры с базой данных соединений с известными мишенями. Принцип "молекулярного сходства" говорит о том,

что подобные мишени связываются с подобными соединениями и является основополагающим для данного подхода. Чаще всего при проведении моделирования используют 2D дескрипторы, такие как «круговые отпечатки» и «целевой фишинг», также могут использоваться 3D химические дескрипторы, которые зачастую являются более мощными для поиска сходства [A.Bender, 2004].

Использование обучающих выборок представляется несколько более сложным методом прогнозирования мишеней для малых молекул. Многомерные модели, полученные в результате анализа данных, отличаются от поиска сходства в том, что информацию от нескольких лигандов можно рассматривать параллельно. Ограничением данного подхода является необходимость наличия единой номенклатуры для всех соединений, понятной языку программирования, на основе которой может проводиться группировка в соответствии с различными классами активности. Одной из первых программ в этой области является программа PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), основанная на обучении классификатора байесовского типа с применением выборок [V.V.Poroikov et al., 2000]. Чем больше соединений включает себя обучающая выборка, тем точнее представленный прогноз активности интересующего соединения.

1.3.2. Возможности моделирования белок-лигандного взаимодействия

Моделирование процесса связывания лиганда с малой молекулой может быть основанным на структуре самой мишени (structure-based) или на структуре лиганда (ligand-based). Для получения более корректных результатов моделирования часто используются оба подхода. Перечень программ и алгоритмов, которые могут быть использованы для этих целей, достаточно объемный и включает в себя: Dock [T.J.A.Ewing et al., 2001], FlexX [M.Rarey et al., 1996], GOLD [M.L.Verdonk et al., 2003], GLIDE [R.A.Friesner et al., 2004], SLIDE [M.I. Zavodsky et al., 2002], LigandFit

[C.M.Venkatachalam et al., 2003], FRED [M.R. McGann et al., 2003], Surflex [A.N.Jain, 2003] и AUTODock [G.M.Morris et al., 2009]. Основным принципом заключается в том, чтобы найти сходства внутри известной группы лигандов и использовать эти сходства в качестве молекулярных дескрипторов. С помощью специального молекулярного описания можно предсказать наличие других малых молекул, которые могут связываться с этим белком [C.H.Andrade et al., 2010].

Одной из программ, в которой может быть представлена карта взаимодействий интересующего лиганда с различными белковыми партнерами является STITCH (Search Tool for Interacting Chemicals) [M.Kuhn et al., 2008]. Анализируя данные из имеющихся библиотек и литературных источников, а также основываясь на структурной формуле соединения и математическом алгоритме расчета, исследователь может получить пул предсказанных белков-кандидатов, и выбрать зону интереса с последующим планированием экспериментальной работы.

Каждый из представленных подходов не требует лабораторного оборудования, реагентов и специализированного пространства. Однако полученные данные в значительной степени зависят от качества предшествующих экспериментальных данных (например, рентгенструктур в библиотеке данных), навыков и знаний человека, проводящего моделирование, и еще больше зависят от критической оценки полученных данных. При отсутствии тщательно спланированного алгоритма действий, полученные в результате моделирования данные нельзя считать надежными. Для справедливости следует отметить, что подобная проблема возникает не только с вычислительными методами: некачественно проведенный эксперимент с использованием любого метода может дать результаты, сомнительные для анализа.

Метод *in silico* поражает своей производительностью и мощностью доступных инструментов. Вместе с тем, для компьютерного моделирования особенно важно выполнять вычисления с применением множества методов,

поскольку использование только одного подхода может приводить к наличию ложных результатов, в то время как их комбинация представляет собой движущую силу всестороннего раскрытия функционального потенциала, заложенного в структуре лиганда.

Подводя итог данной главы, отметим, что, вне всякого сомнения, концепция «лактат-тупиковый метаболит» отходит в прошлое, уступая место новому подходу «лактат-сигнальная молекула». Вместе с тем, существующие данные очень разрозненны, в основном, это кластерные исследования определенных групп ученых, все это добавляет штрихов, но не позволяет завершить до конца метаболический и функциональный портрет лактата. Применение компьютерных технологий для моделирования потенциальных эффектов и мишеней взаимодействия лактата будет способствовать более полному представлению роли лактата в метаболоме человека. Успешно проведенные эксперименты *in silico* станут основой выбора модельных систем для будущего исследования влияния лактата и других низкомолекулярных лигандов на процессы белок-белкового взаимодействия, а также представят наиболее вероятных каталитических белков-кандидатов для оценки влияния на функциональное проявление белка в условиях фермент-субстратного комплекса.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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».

Диссертационное исследование проводилось в несколько этапов:

Этап 1. Анализ спектра биологической активности лактата с использованием программ компьютерного моделирования PASS и STITCH.

Этап 2. Изучение влияния лактата на процесс протекания реакции антиген-антитело с использованием модельной системы групп крови АВ0 (гликопротеины А и В), естественных и моноклональных антител.

Этап 3. Визуализация изменений, вызываемых внесением лактата в экспериментальную систему, на образование комплексов антиген-антитело с использованием методов конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

Этап 4. Установление факта взаимодействия оксалоацетата с каталитическим белком лактатдегидрогеназой и выявление влияния этого интермедиата на термостабильность лактатдегидрогеназы методами микрокапиллярного термофореза и дифференциальной сканирующей флуориметрии.

Этап 5. Выявление влияния оксалоацетата на функционирование лактатдегидрогеназной каталитической системы.

2.1 Общая характеристика обследованной группы

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 (рисунок 2.1).



Рисунок 2.1 – Характеристика обследованной группы

Исследовали венозную кровь, полученную методом пункции локтевой вены, которую затем собирали в пробирки для взятия крови фирмы «VACUTAINER» (США). Всем обследованным проводилось определение принадлежности крови по системе АВ0, содержание лактата, пирувата, активности лактатдегидрогеназы. В качестве консерванта при определении содержания лактата использовали пробирки с фторидом натрия и оксалатом, для определения пирувата и лактатдегидрогеназы использовали пробирки, содержащие гепарин. Для определения группы крови по системе АВ0

пользовались пробирками, содержащими ЭДТА в качестве консерванта. Полученную кровь помещали в центрифугу на 5 минут, 1700 g.

2.2 Определение группы крови по системе АВ0 и компонентного состава лактатдегидрогеназной каталитической системы

Группу крови по системе АВ0 определяли перекрестным методом на плоскости с использованием моноклональных антител эритроцит-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 лиц по групповой принадлежности крови (AB0) в наблюдаемой группе оказалось следующим (рисунок 2.2).

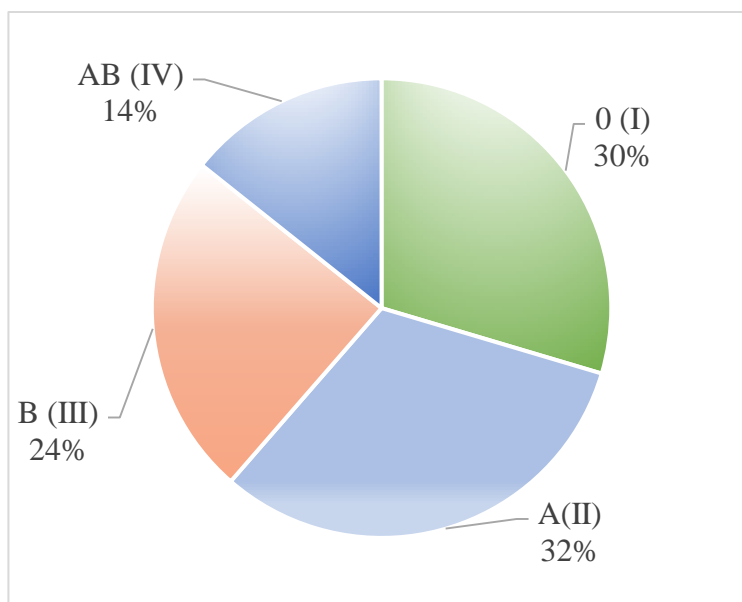


Рисунок 2.2 – Распределение по группам крови АВ0 в исследуемой группе

Проводили измерение содержания лактата, пирувата, активности лактатдегидрогеназы в крови практически здоровых лиц с 0 (I)- AB (IV) группами крови 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. При добавлении аминоантипирина-4 к пероксиду водорода под воздействием пероксидазы развивается окрашивание, интенсивность которого пропорциональна содержанию лактата. Абсорбция измеряется при длине волны 552 нм.

Измерение содержания **пирувата** проводили с применением ферментативного кинетического 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 лактат до пирувата с одновременным восстановлением НАД до НАДН в равных соотношениях, при этом скорость перехода НАД в НАДН прямо пропорциональна активности лактатдегидрогеназы. Абсорбция измеряется при длине волны 340 нм.

Дальнейшее исследование проводилось в соответствии с представленным дизайном (рисунок 2.3).

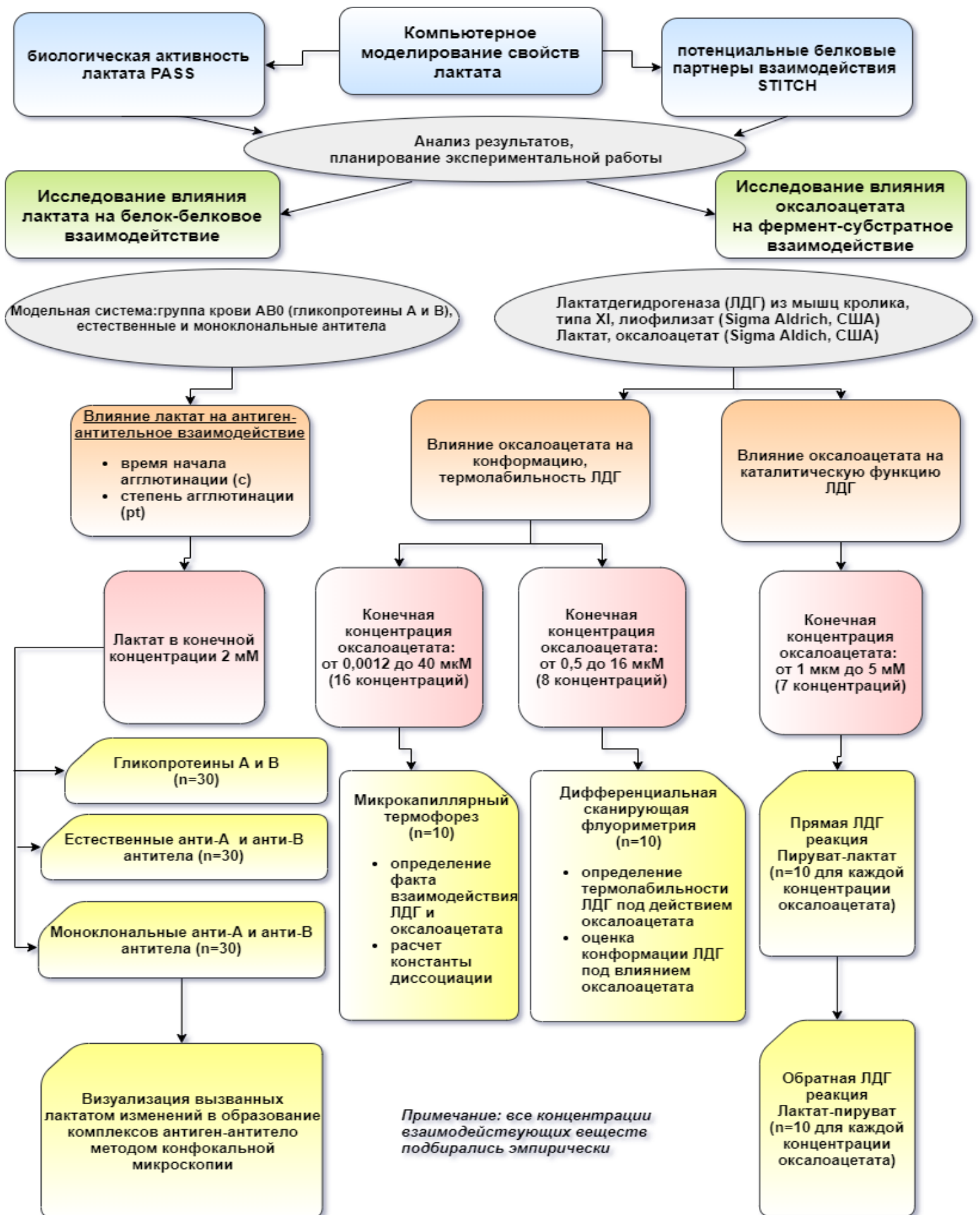


Рисунок 2.3 – Дизайн исследования

2.3 Изучение взаимодействия белок-лиганд с использованием экспериментальной системы антиген-антитело (группы крови АВ0)

Экспериментальной системой для изучения влияния малого метаболита лактата на процесс белок-белкового взаимодействия была выбрана модель групп крови по системе АВ0. В качестве антигенов выступали поверхностные антигенные детерминанты эритроцитов А и В, в качестве антител – естественные анти-А и анти-В антитела плазмы и моноклональные анти-А и анти-В антитела (рисунок 2.4).

Количество лактата подбиралось эмпирически и составляло от 0,1 до 2 мМ. Время инкубации лактата с антигенами и антителами определяли экспериментально из расчета, что все молекулы анализируемого метаболита вступят во взаимодействия с экспериментальной системой. Мы использовали стандартные эритроциты фирмы ReversCell (США) и моноклональные антитела «ЭритроТест» (Россия). Влияние лактата на систему «антиген-антитело» оценивали, используя два параметра: степень и время начала агглютинации.

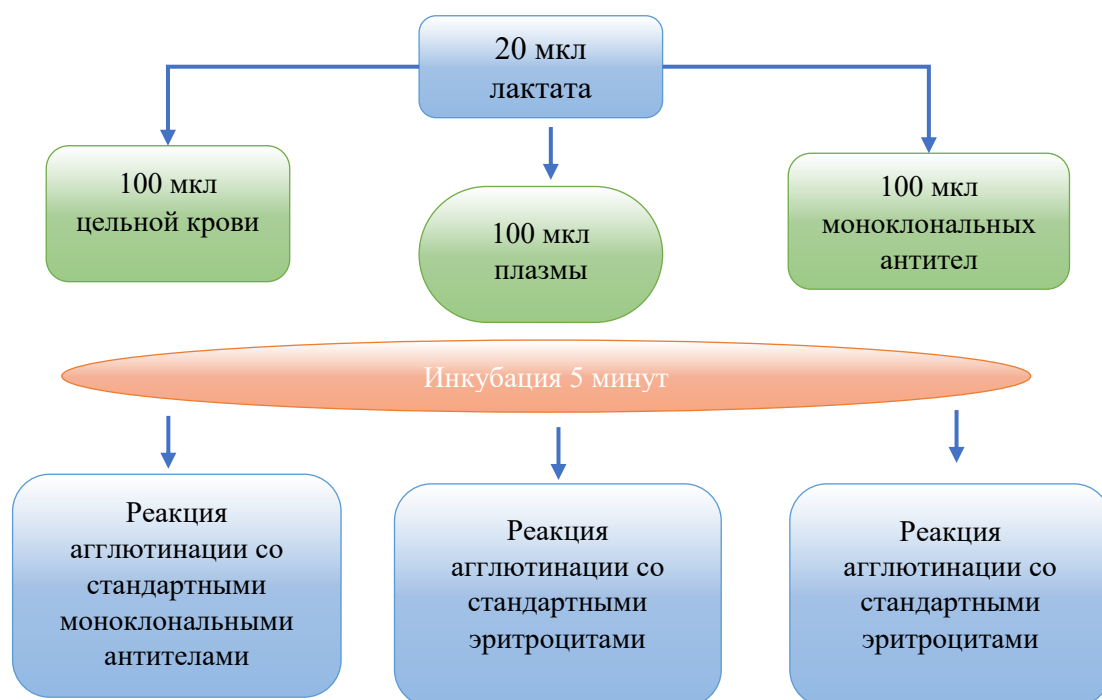


Рисунок 2.4 – Схема проведения эксперимента по изучению влияния лактата на белок-белковое взаимодействие

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]. Преимуществом данного метода оценивания является отхождение от привычной оценки агглютинации количеством знаков «+» и переход на более объективную систему описания результатов реакции (таблица 2.1).

Таблица 2.1 – Определение степени агглютинации эритроцитов по W.L.Marsh (1972).

Балл	Символ	Макроскопическое описание	Микроскопическое описание
12	С	Полная агглютинация	Нет свободных эритроцитов
11-10	+++	Сильная агглютинация, единый комок или два крупных комка	Визуализируется несколько комплексов агглютинатов
9-8	++	Сильная агглютинация. Несколько крупных комков	Крупные агглютинаты окружены более мелкими комплексами, наблюдаются единичные эритроциты
7-5	+	Большое количество малых комков	Небольшие комплексы, состоящие из 20 эритроцитов, окруженные свободными эритроцитами
4-3	±	Слабая агглютинация в клеточной суспензии	Агглютинаты из 6-8 клеток, преобладают свободные эритроциты
2	W	Клеточная суспензия	Малое количество агглютинатов из 4-6 клеток, преобладают свободные эритроциты
0	-	Нет признаков агглютинации	

2.4 Компьютерное моделирование биологической активности лактата в среде PASS

Опорным пунктом в понимании биологической роли того или иного вещества является характеристика его биологической активности. Принимая во внимание тот факт, что в настоящее время известно более 644 миллиардов структурных формул, содержащих такие химические элементы как С, N, O, S, применение экспериментальных подходов на ранних этапах анализа соединения доказывает свою экономическую нерациональность [L.Ruddigkeit et al., 2013]. Все большее распространение сегодня получает применение программ компьютерного скрининга биологической активности, которые работают на основе заданных алгоритмов и обучающих выборок и позволяют провести ориентирование во множестве возможных эффектов, оказываемых соединений и наметить план проведения более детальных исследований.

Программа PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), использованная нами в рамках диссертационного исследования, относится к методам виртуальной хемогеномики и позволяет *in silico* определить наиболее вероятные лиганды для известных мишеней, мишени для известных лигандов и охарактеризовать спектр биологической активности исследуемого вещества [В.В.Поройков и соавт., 2009].

Прогнозирующая система данной программы состоит из нескольких компонентов: обучающая выборка, представление биологической активности, описание химической структуры, математический метод анализа «структура-активность» и прогноз биологической активности. Данная база включает различные виды активностей, включая блокирование, активирование, высвобождение эндогенных биорегуляторов [Д.А.Филимонов и соавт., 2006].

Обучающая выборка программы PASS на 2017 год содержала 8054 терминов биологической активности, 106816 MNA-дескрипторов, 7604

правила о зависимости «структура-активность» [Д.А. Филимонов и соавт., 2018].

Для описания структурной формулы исследуемого вещества используются MNA-дескрипторы, они состояются на основе валентностей и зарядов атомов, но без учета типа связей, что исключает различение одной и той же химической формулы, но и не дает возможность сравнения биологической активности стереоизомеров.

Результат анализа выдается в виде упорядоченного списка вероятностей проявления активности от P_a (быть активным) и P_i (быть неактивным) от наиболее к наименее вероятному. Вероятность P_a отражает сходство структуры молекул исследуемого вещества со структурами, представленными в обучающей выборке. Чем больше для вещества значение P_a и одновременно с этим чем ниже значение P_i , тем выше шанс экспериментального подтверждения спрогнозированной активности. Однако, авторами программы не рекомендуется выставление критериев с учетом только лишь высоких значений P_a , поскольку при работе в таком режиме велика вероятность пропуска важных биологических эффектов, оптимальным считается режим, при котором $P_a > P_i$.

2.5 Компьютерное моделирование потенциальных белковых партнеров лактата в среде STITCH

Другой программой, использованной нами, явилась STITCH (Search Tool for Interacting Chemicals), которая позволяет спрогнозировать мишени белковой структуры для исследуемого объекта [M. Kuhn. et al., 2014]. На сегодняшний день данная база содержит сведения об 1,6 миллиардах взаимодействиях. STITCH консолидирует в себе многочисленные данные о строении и взаимодействии различных видов химических структур, используя такие базы данных как PDB, KEGG, Reactome, GLIDA, PharmGKB и другие, список библиотек расширяется постоянно [D. Szklarczyk et al.,

2016]. Кроме того, информация в STITCH поступает так же из литературных источников. В зависимости от степени доказанности взаимодействия, каждое из них получает различный доверительный балл: например, взаимодействия, описанные в библиотеках типа KEGG и PDB, получают наивысший балл, а полученные с использованием интеллектуального анализа экспериментальных работ - наименьший. На основе ранжирования доверительных баллов выстраиваются сети взаимодействия: от наиболее вероятных мишеней к наименее вероятным.

STITCH позволяет оценивать белковое разнообразие различных живых организмов, а для организма человека имеется возможность выбора поиска взаимосвязей в зависимости от интересующей ткани и органа.

2.6 Визуализация взаимодействия белок-белок методом сканирующей лазерной конфокальной микроскопии

Конфокальная микроскопия относится к числу визуализирующих методик, позволяющих идентифицировать не только клетки и клеточные структуры, но и отдельные молекулы, а также процессы взаимодействия молекул с более крупными структурами.

Основным достоинством конфокальной микроскопии по сравнению со световыми микроскопами является получение более контрастного изображения, которое достигается путем отсекания внефокусных лучей с использованием диафрагмы малого размера. Во время конфокальной микроскопии в каждый момент времени происходит регистрация только одной точки исследуемого объекта, а целое изображение формируется за счет последовательного «сканирования» изучаемой области.

В настоящее время конфокальная микроскопия решает триединую задачу: визуализация тонких молекулярных структур, определение колокализации и изучение динамических процессов, происходящих в клетке и за ее пределами [Г.И.Штейн, 2007].

В рамках диссертационного исследования визуализацию взаимодействия белок-белок проводили с использованием конфокального микроскопа Olympus IX 71 (Япония) со сканирующим блоком и лазерным комбайном (ANDOR). Конфокальную микроскопию проводили с использованием двух режимов: микроскопия в видимом свете и с использованием лазерной флуоресценции. В качестве источника излучения использовали лазерные излучатели мощностью 100 Вт на длинах волн 488 и 561 нм. Данная установка обеспечивает скорость сканирования до 25 слоев в секунду, что позволяет получить детальные микрофотографии исследуемого взаимодействия в высоком разрешении.

Проводили обработку шумовых пикселей полученных микроснимков. Для уменьшения шума и увеличения контрастности микроснимков использовался фильтр с порогом порядка 5 % от максимальной интенсивности кадра и заменой его на нулевой сигнал. Оценка площади кадра, занимаемого агрегатами, проводилась с помощью программы Andor IQ.

Производили подсчет содержания эритроцитов на гематологическом анализаторе Sysmex KX 21 (Roche Diagnostics, Швейцария), затем разводили цельную кровь с помощью солевого раствора FAX flow до примерного содержания 1×10^6 /л эритроцитов. Инкубировали 100 мкл полученного разведения эритроцитов с 20 мкл лактата в конечной концентрации 2 мМ в течение 5 минут. После инкубации проводили реакцию агглютинации гликопротеинов А и В со специфическими мечеными антителами: моноклональные конъюгированные антитела Blood group A antigen (Z2A), Blood group B antigen (89-F). В качестве флуоресцентной метки использовали флуоресцеинизотиоционатом (ФИТЦ) фирмы Santa Cruz biotechnology, Inc. (США). Контролем служила проба без добавления лактата. Время постановки реакции – 20 минут в условиях затемненного помещения. Далее проводили регистрацию образования комплексов антиген-антитело с использованием экспериментальной установки.

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

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

Раствор оксалоацетата готовился *ex tempore* для каждой серии экспериментов, поскольку при нахождении в разведенном состоянии более 2 часов при комнатной температуре наблюдается самопроизвольное декарбоксилирование оксалоацетата, степень перехода в пируват составляет в среднем 15% каждые два часа [H.M.Wilkins et al., 2014].

2.7 Установление факта взаимодействия оксалоацетата и лактатдегидрогеназы методом микрокапиллярного термофореза

Микрокапиллярный термофорез описывает направленное движение молекул в температурном градиенте и основан на генерации локально ограниченного и высокоточного изменения температуры образца с помощью инфракрасного (ИК) лазерного излучения, эффект которого не может быть повторен с помощью обычных тепловых элементов [C.G.Alexander et al., 2014]. Основополагающий физический принцип микротермофореза объясняется силой взаимодействия между двумя молекулами путем обнаружения изменения флуоресцентного сигнала меченой молекулы. Изменение флуоресцентного сигнала находится в зависимости от двух факторов: первый связан с температурой и химической природой флюорофора, которая может быть изменена при связывании лиганда с предполагаемым белком. Второй фактор непосредственно основан на явлении термофореза - движение флуоресцентных молекул в температурном градиенте приводит к количественному изменению локальной концентрации

и, следовательно, наблюдаемой флуоресценции. Степень изменения концентрации зависит от общих свойств молекулы, таких как размер, заряд и конформация (рисунок 2.5).

Эксперименты выполнены на оборудовании Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies GmbH). Фермент лактатдегидрогеназа и оксалоацетат разводились в трис-НСl буфере.

Мечение лактатдегидрогеназы осуществляли с использованием стандартного набора L001 для маркировки белка «Monolith NT Protein Labeling Kit RED-NHS» (NanoTemper Technologies, Германия). Действие выбранного флюорофора NT-647-NHS основано на реакционноспособном активированном N-гидроксисукцинимидный эфире (NHS), который обеспечивает ацилирование алифатических ε-аминогрупп лизина с формированием высокостабильных комплексов краситель-белок. Фермент растворяли в буфере трис-НСl рН 7,5, до получения концентрации 20 мкМ. Твердый флуоресцентный краситель NT-647-NHS растворяли в 100% ДМСО в концентрации 470 мкМ и тщательно перемешивали. До соединения белка и красителя, концентрацию флюорофора увеличивали трехкратно (60мкМ) с использованием буфера. Затем белок и растворы флуоресцентного красителя смешивали в соотношении 1: 1 и инкубировали в течение 30 минут при температуре 25°C в темноте. Непрореагировавший «свободный» краситель удаляли методом гельфильтрации (стандартны колонки В-Column).

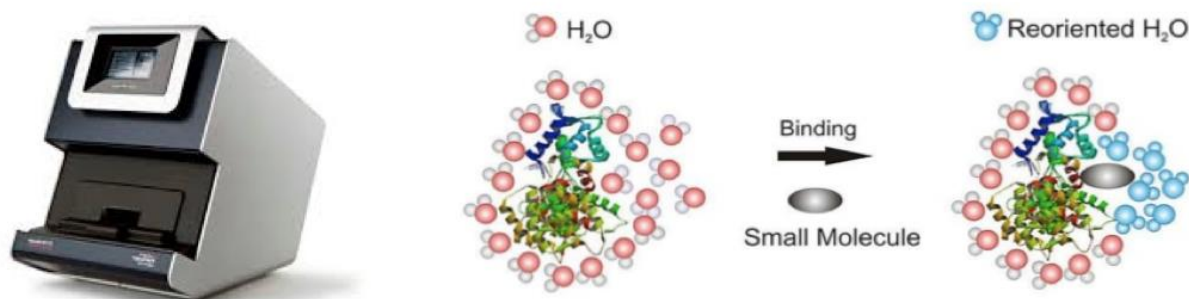


Рисунок 2.5 – Принцип работы прибора Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies GmbH) <https://www.sygnaturediscovery.com/drug-discovery/bioscience/biophysical-assays/microscale-thermophoresis-mst/>

Для расчета константы диссоциации (K_d) методом микротермофореза готовили серию разведений лактатдегидрогеназы и малой молекулы лактата, где конечная концентрация меченного белка подбиралась эмпирически и оставалась постоянной (1,65 мкМ), а количество добавляемого лактата варьировало от 40 мкМ до 0,0012 мкМ. Комплексы инкубировались при температуре 25°C в буфере, содержащем 50мМ Трис-Н-Cl, pH 7,5. Реакционную смесь вносили в объеме 4 мкл в специализированный капилляры с последующим проведением термофореза. При измерении работали с инфракрасным фильтром, интенсивность лазера (MST power) составляла 40%, интенсивность светоизлучающего диода (LED power) – 100%.

Определяли изменение в нормированной флуоресценции (ΔF_{norm}), показателе, отображающем изменение концентрации молекул и рассчитываемом по формуле $\Delta F_{norm} = F_{hot}/F_{cold}$ (F- средние значения флуоресценции между определенными областями, F_{hot} – флуоресценция области высоких температур, F_{cold} – флуоресценция области низких температур) [M. Jerabek-Willemsen et al., 2014]. Далее строили график зависимости ΔF_{norm} от логарифма концентраций. Обработка полученных результатов и расчет константы диссоциации на основе закона действующих масс производились с использованием пакета программ NT Analysis Software [C.J.Wienken et al., 2010].

2.8 Оценка влияния оксалоацетата на термостабильность лактатдегидрогеназы методом дифференциальной сканирующей флуориметрии

Оценка термической стабильности белка является важной частью фундаментальных исследований [G.Senisterra et al., 2012]. В основе анализа фолдинга белка методом дифференциальной сканирующей флуориметрии лежит (Differential Scanning Fluorimetry, DSF) свойство аутофлуоресценции белков по молекулам триптофана (рисунок 2.6). Триптофан является

гидрофобной аминокислотой и наибольшее его скопление отмечается в гидрофобных карманах белка, недоступных для молекулы воды. При тепловой денатурации белка происходит «разворачивание» гидрофобных участков и обнажение молекул триптофана, что изменяет спектральные свойства всего белка [G.R.Grimsley et al., 2013].

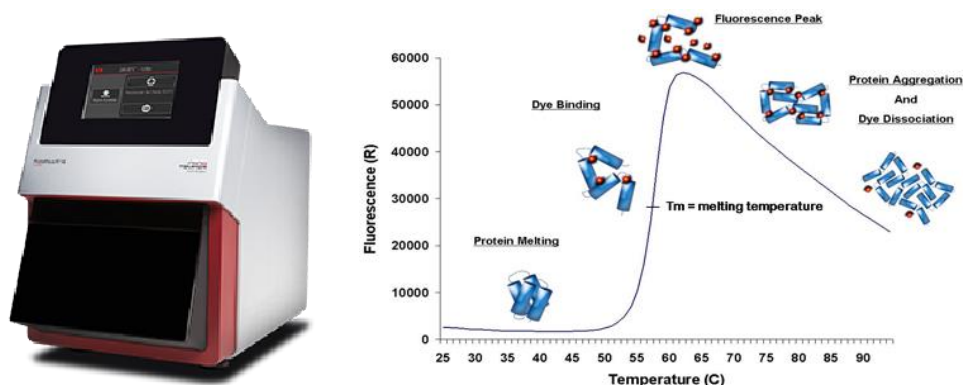


Рисунок 2.6 – Принцип работы прибора Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies GmbH)

http://www.bio.anl.gov/molecular_and_systems_biology/Sensor/sensor_images/asay_theory_figure.png

Регистрируются изменения интенсивности флуоресценции триптофана и смещение пиков при переходе белка из свернутого состояния в более развернутую конформация. Температура, при которой половина молекул белка подверглась тепловой денатурации, а половина сохранила свою нативную конформацию называется температурой плавления (T_m) (температурой теплового перехода). По оценке изменений данного интегрального показателя можно судить об эффекте оказываемом лигандом на конформацию белка.

Оценку конформационной стабильности белка проводили на приборе Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies, Германия). Регистрировали изменение эндогенной флуоресценции триптофана и тирозина при длинах волны 330 и 350 нм. Результат записывался в градусах Цельсия, что соответствовало температуре плавления белка (T_m). Для проведения

эксперимента готовили разведения лактатдегидрогеназы и лактата. Концентрация фермента составила 1 мкМ и не менялась на протяжении всей постановки опыта, конечная концентрация лактата изменялась и составляла 16 мкМ, 8 мкМ, 4 мкМ, 2 мкМ, 1 мкМ и 0,5 мкМ соответственно. Полученную реакцию 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%.

2.9 Определение влияния оксалоацетата на функционирование лактатдегидрогеназной каталитической системы

Влияние оксалоацетата на каталитическую 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.

Состав реакционной смеси следующий:

Контрольная проба: 198 мкл PBS буфера Ph=7,4 + 2 мкл лактатдегидрогеназы

Опытная проба: 196 мкл PBS буфера Ph=7,4 + 2 мкл оксалоацетата + 2 мкл лактатдегидрогеназы

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.

Принцип определения активности ЛДГ в прямой реакции:

К контрольной и опытной пробе на борту анализатора добавлялись реагенты:

НАДН – 0,16 мМ

Пируват -0,52 мМ

Фосфат -48 мМ

pH – 7,5

Пируват в присутствии НАДН+Н⁺ под действием ЛДГ конвертируется в L-лактат с образованием НАД⁺. Активность ЛДГ прямо пропорциональна степени убыли НАДН, абсорбция регистрируется при длине волны 340 нм.

Принцип определения активности ЛДГ в обратной реакции:

К контрольной и опытной пробе на борту анализатора добавлялись реагенты:

НАД-9,0 мМ

Лактат лития – 44,9 мМ

N-метил-D-глюкамин -290 мМ

pH-9,4

L-лактат в присутствии НАД⁺ конвертируется в пируват с образованием НАДН+Н⁺ под действием ЛДГ. Скорость образования НАДН прямо пропорциональна каталитической активности ЛДГ, регистрируется по повышению абсорбции при длине волны 340 нм.

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 пирогалловым красным, интенсивность окраски пропорциональна содержанию белка в пробе, абсорбция измеряется при 583 нм. На основании получившихся данных об активности фермента и содержания белка в пробе проводили расчет удельной активности фермента (МЕ/мг белка).

Для выражения активности фермента можно использовать следующие условные величины: МЕ (международная единица активности), которая отражает количество фермента, которое превращает 1 мкмоль субстрата за 1 минуту; Кат (катал), который отражает количество фермента, превращающего 1 моль субстрата за 1 секунду. Также возможно использовать понятие удельной активности фермента (уд.ак.), которая определяется как отношение единиц активности фермента (МЕ) к содержанию белка в данном образце (мг) [Е.С.Северин, 2009]. Для описания активности лактатдегидрогеназы мы решили использовать удельную активность.

2.10 Статистическая обработка результатов исследования

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 показал, что требуется применение как параметрических, так и не параметрических методов анализа.

Для признаков, которым было характерно нормальное распределение, производили расчет среднего значения (M) и стандартного отклонения (m). Среднее значение отражает центральную тенденцию и зависит от однородности данных, составляющих выборку. Стандартное отклонение отражает степень рассеивания конкретного значения в сравнении с математическим ожиданием.

Достоверность различия средних значений в выборках проверяли с использованием t -критерия Стьюдента. Критическое значение уровня значимости принимали равным 0,05.

Вариационные ряды описывали с использованием медианы (Me), нижнего и верхнего квартиля, квартильного размаха. Верхний и нижний

квартиль вместе с медианой разделяют вариационный ряд на четыре части, позволяя составить более полное представление о значениях, составляющих данный вариационный ряд. Сравнение внутри отдельных групп проводили с применением критерия Манна-Уитни-Вилкоксона.

Для анализа кривых плавления лактатдегидрогеназы при влиянии оксалоацетата нами была разработана математическая модель следующего вида, аппроксимирующая полученные данные:

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

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.Koya, 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. После построения регрессионных моделей (по одной математической модели для каждого интермедиата в различных концентрациях) проводили содержательный анализ их параметров. По оцененным статистическим пакетом 95% доверительным интервалам регрессионных коэффициентов судили о статистической значимости различий между кривыми плавления ЛДГ с разными концентрациями оксалоацетата.

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.

ГЛАВА 3.

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛАКТАТА

3.1 Компьютерное моделирование биологической активности лактата в среде PASS

Молекулярное моделирование представляет собой важный инструмент, позволяющий предсказывать наиболее значимые характеристики исследуемого соединения, визуализировать его взаимодействие с интересующими мишенями, оценивать степень вероятности наличия спрогнозированных эффектов. Возможности, которые сегодня представляет исследователю метод *in silico*, позволяют отнести его к разряду самостоятельной экспериментальной работы.

Предполагая, что биологическая активность химического соединения тесно связана с его химической структурой и опираясь на принцип «молекулярной схожести», мы выбрали для целей компьютерного моделирования программу, разработанную группой отечественных ученых под руководством В.В.Поройкова под названием PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) [В.В.Поройков, 1999]. Эта программа прогнозирует все виды биологической активности, которые исследуемое вещество может проявить при взаимодействии с другими биологическими объектами.

Прогноз строится на основе структурной формулы и зависящих от нее MNA-дескрипторов (Multilevel Neighborhoods of Atoms). Предсказанные возможности описываются с помощью двух показателей: P_a (быть активным) и P_i (быть неактивным), каждое из которых может принимать значение от 0 до 1. Результат представляется в виде вероятного списка активностей, расположенного по убыванию значения P_a , для которых выполняется условие $P_a > P_i$, что снижает вероятность ошибок и ложных результатов. Данная программа помогает установить вероятные мишени для известных лигандов, вероятные лиганды для известных мишеней, а также список

фармакологических эффектов и вероятные причины токсичности химического вещества. Стоит отметить, что библиотека PASS постоянно пополняется с помощью обучающих выборок [В.В.Поройков и др., 2009].

Программа PASS версии 1.917, которой мы пользовались в нашей работе, располагала 2800 различными биологическими видами активностей, включая фармакологические эффекты, молекулярные механизмы, метаболически опосредованные действия, а также побочные эффекты и токсичность.

В качестве объекта компьютерного моделирования использовался лактат, как один из наиболее важных, но вместе с тем несколько недооцененный метаболит клетки, биологический потенциал которого еще не был раскрыт полностью.

Лактат (2-гидроксипропионат) - один из основных интермедиатов обменных путей. Он имеет константу диссоциации $pK_a=3,86$, что на единицу меньше константы диссоциации уксусной кислоты, соответственно, данный метаболит депротонируется в 10 раз легче. Более выраженные кислотные свойства объясняются наличием водородной связи между α -гидроксильной и карбоксильной группами. Поэтому при физиологических условиях, лактат почти полностью диссоциирует на протон водорода и анион кислотного остатка ($C_3H_5O_3^-$). Молекулярная масса лактата составляет 89,07 г/моль. Топологическая площадь полярной поверхности лактата $60,4 \text{ \AA}^2$, что делает его доступным для прохождения гематоэнцефалического барьера [S.A.Hitchcock, L.D.Pennington, 2006]. Данный интермедиат является хиральной молекулой и имеет левовращающий (L-лактат) и правовращающий (D-лактат) изомеры.

Лактат имеет в своем составе две функциональные группы: гидроксильную (ОН-) и карбоксильную (СООН-), что обуславливает высокую химическую активность данного соединения (рисунок 3.1). Лактат вступает в реакцию окисления по гидроксильной группе с образованием кетокислоты пирувата. Также возможно протекание реакций

электрофильного замещения по карбоксильной группе (реакции этерификации), атом углерода которой находится в состоянии sp^2 гибридизации и обеспечивает взаимодействие с другими органическими соединениями (карбоновые кислоты, спирты, амины).

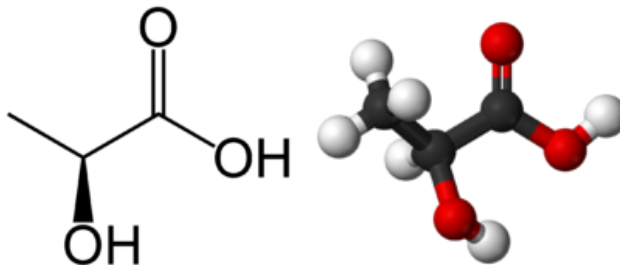


Рисунок 3.1 – Молекулярная и 3D структуры лактата

Концентрация лактата в венозной крови составляет 0,5-2,2 ммоль/л, а в артериальной – 0,5-1,6 ммоль/л соответственно. Однако, во время и после активной физической нагрузки концентрация этого соединения может достигать 20-25 ммоль/л [P.G. Rosenstein et al., 2018].

Кристаллы лактата имеют цвет от белого до желтоватого, без запаха, с легким кислотным вкусом, полностью растворимы в воде и спиртах. Температура плавления составляет 53°C, а температура кипения 122°C. Раствор лактата имеет pH 1,75 [M.J.O'Neil, 2013].

Несмотря на важную метаболическую роль в поддержании гомеостаза и энергетического статуса клетки этот метаболит, по имеющимся у нас данным, ранее не подвергался компьютерному моделированию биологической активности.

Анализ результатов компьютерного прогноза лактат программой PASS версии 1.917 показывает, что данный интермедиат способен оказывать 318 фармакологических эффекта из 501 возможного, имеет 2108 из возможных 3295 молекулярных механизмов действия. Отмечено наличие 177 метаболически опосредованных действий, 52 побочных действий и токсичности (рисунок 3.2). Далее в нашей работе учитывались активности, для которых $P_a > 0,5$.

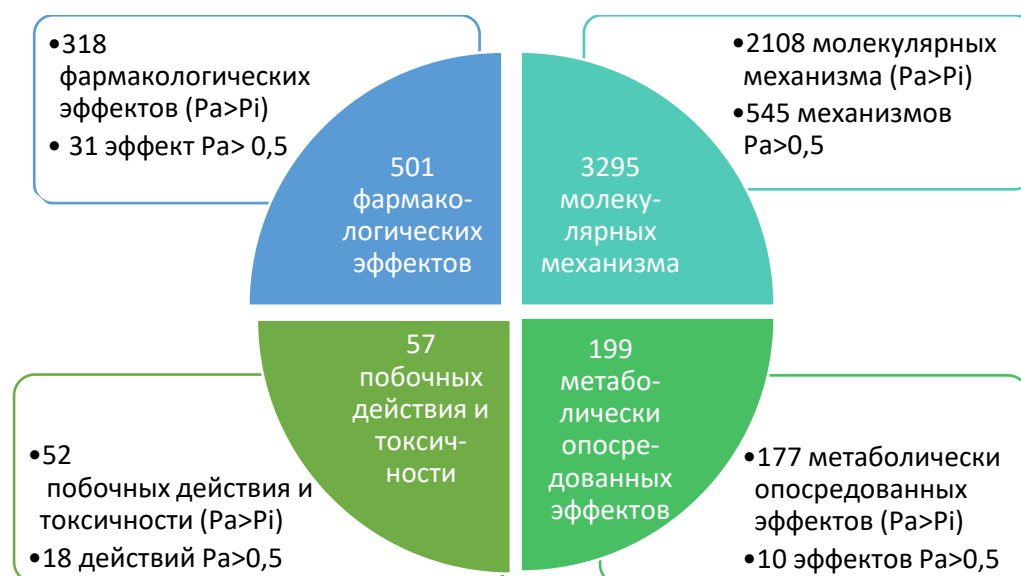


Рисунок 3.2 Анализ результатов вероятной активности лактата программой PASS (P_a – вероятность проявления эффекта)

Лактат способен оказывать иммуномодулирующее (P_a 0,811), иммуностимулирующее (P_a 0,808) и противовоспалительные действия (P_a 0,692). В эксперименте R.Naas [R.Naas et al., 2015] с CD4+ и CD8+ рецепторами, были установлены одни из вероятных механизмов осуществления данных эффектов: взаимодействие лактата с CD4+ рецептором приводило к синтезу провоспалительного цитокина интерлейкина-17, а с CD8+ потерю его цитолитической функции. Обсуждается роль лактата и в процессах аутоиммунного воспаления [V.Pucino et al., 2017], например, при ревматоидном артрите увеличивается число экспрессируемых транспортеров лактата МСТ-4, что служит критерием активности воспалительного ответа. Возможно, блокирование указанных каналов уменьшит ацидификацию синовиальной жидкости и воспалительные внутрисуставные проявления.

Рассмотрим фармакологические эффекты лактата (рисунок 3.3). Из 318 возможных фармакологических эффектов, 31 удовлетворяет нашему условию $P_a > 0,5$.

Влияние на иммунную систему и воспалительный ответ

- Иммуномодулирующий эффект (Pa 0,811)
- Иммуностимулирующий эффект (Pa 0,808)
- Противовирусный эффект (Pa 0,753)
- Противовоспалительный эффект (Pa 0,692)
- Противоопухолевый эффект (Pa 0,607)
- Антибактериальный эффект (Pa 0,583)

Влияние на систему кроветворения

- Стимулятор лейкопоза (Pa 0,803)
- Стимулятор эритропоза (Pa 0,673)

Влияние на нервную и сердечно-сосудистую систему

- Ангиопротективный эффект (Pa 0,681)
- Нейропротектор (Pa 0,646)
- Антинейротоксический эффект (Pa 0,639)

Влияние на метаболизм

- Регулятор метаболизма липидов (Pa 0,784)
- Антигиперхолестеринемический эффект (Pa 0,526)

Рисунок 3.3 – Фармакологические эффекты лактата (Pa – вероятность проявления эффекта)

Противовирусный эффект лактата (Pa 0,753) в отношении риновирусов, пикорнавирусов и арбовирусов может быть объяснен наличием pH-зависимых перестроек в структуре вируса. С понижением pH среды устойчивость вируса снижается, что приводит к нарушению взаимосвязи между рибонуклеопротеинами и белковым матриксом и сбою процесса репликации [О.П. Жирнов и др., 2014].

Известно, что рост опухолевых клеток сопровождается значительным образованием лактата и изменением рН среды, получившее название эффекта Варбурга. Однако, роль лактата в развитии и течении опухолевых процессов гораздо шире. В качестве примера можно привести данные о том, что путь макрофагов к опухолевым клеткам опосредован концентрацией лактата, они устремляются к участку, где концентрация этого метаболита максимальная. [K. Fischer et al., 2007].

Антибактериальная эффективность лактата (Pa 0,538) иллюстрируется в работе Y.Cheng [Y.Cheng et al., 2015]. В качестве антибактериального покрытия титановых имплантов, применяемых при ортопедических и травматологических операциях было выбрано напыление наночастицами, содержащими бром и молочную кислоту. Полученные результаты свидетельствовали об отсутствии роста микрофлоры на имплантах, кроме того, такое покрытие стимулировало рост клеток костной ткани и активировало репаративные процессы.

Спрогнозирована возможность лактата влиять на процессы лейкопоэза (Pa 0,803) и эритропоэза (Pa 0,673). Известно, что поддержание баланса между аэробным и анаэробным метаболизмом является эссенциальным фактором для нормального протекания гемопоэза. В случае исключения фермента лактатдегидрогеназы из гемопоэтического окружения наблюдали снижение скорости образования как эритроцитов, так и лейкоцитов [Y.H.Wang et al., 2015].

Лактат способен оказывать ангиопротективный (Pa 0,681), нейропротективный (Pa 0,646), антинейротоксический эффекты (Pa 0,639). Посредством трансаминирования лактат способен снижать высокие концентрации глутамата, тем самым уменьшая его нейротоксическое воздействие [J.Ros et al. 2001]. Недавнее исследование [A. Banerjee et al., 2016] показало, что во время ишемии содержание лактата в головном мозге увеличивается до 30 ммоль/мл, что, однако, не является повреждающим фактором, а напротив, служит мерой защиты нейронов головного мозга от

последствий ишемии. Такое содержание лактата в том числе способно активировать TREK-1 натриевые каналы, чьими функциями и опосредовано нейропротективное действие.

Предсказана активность лактата в отношении обмена липидов (Pa 0,784) и регулирования содержания холестерина (Pa 0,526). В клинической практике на основании этой взаимосвязи предложен индекс лактат/холестерин для оценки вероятности наступления сердечно-сосудистой смертности в течение 60 дней [F.Desmoulin et al., 2013]. Считается, что высокое содержание лактата и одновременно низкое содержание холестерина сопряжено с высоким сердечно-сосудистым риском. В качестве еще одного примера влияния лактата на уровень холестерина приведем исследование, в котором пероральный прием продуктов, обогащенных лактатом, приводил к снижению показателей холестерина, при чем содержание REBP-2 белка, отвечающего за синтез холестерина, было понижено, а белка CYP7a1, участвующего в катаболизме холестерина – повышено [M.Kobayashi et al., 2012].

При анализе спрогнозированных биологических активностей лактата отмечено его влияние на обмен углеводов, аминокислот и белков, липидов, окислительное фосфорилирование, многие сигнальные пути.

Рассматривая влияние лактата на обмен углеводов необходимо отметить, что его эффекты распространяются на все известные анаболические и катаболические пути (таблица 3.1). Например, в гликолитическом превращении глюкозы лактат проявляет способность ингибировать триозофосфат изомеразу (Pa 0,551), глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу (0,578). Учитывая многочисленные неметаболические функции глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы, такие как поддержание цитоскелета клетки [K.W.Volker et al., 1995], транспорт везикул [E.J.Tisdale et al., 2009; A.V.Bryksin, P.P.Laktionov, 2008], регуляция экспрессии генов [D.A.Butterfield et al., 2010], участие в патогенезе нейродегенеративных заболеваний [I.Naletova et al., 2008], регулирование подвижности

сперматозоидов [V.I.Muronetz et al., 2015], влияние лактата на данный фермент представляется крайне важным механизмом опосредованного регулирования и всех этих процессов.

Велика роль лактата в регуляции цикла трикарбоновых кислот. Описываемый метаболит наделен способностью ингибировать многие ферменты, в том числе пируватдегидрогеназу (Pa 0,892), аконитат декарбоксилазу (Pa 0,796), изоцитратлиазу (Pa 0,623), оксалоацетат декарбоксилазу (Pa 0,742), фумарат дегидрогеназу (Pa 0,579).

Отдельно стоит рассмотреть способность лактата ингибировать лактатдегидрогеназу (Pa 0,892). Данный фермент является ключевым в метаболизме указанного интермедиата. Лактатдегидрогеназа катализирует обратимое превращение пирувата в лактат [M.Rogatzki et al., 2015]: соотношение лактат-пируват для печени 7:1, 13:1 для мышцы в состоянии покоя [K.Y.Liaw et al., 1985], 159:1 для мышцы после истощающей физической нагрузки [K.Sahlin et al., 1976], 23:1 для головного мозга [J.Sahuquillo et al., 2014]. Также этот фермент является формирующим звеном одноименной челночной системы, осуществляющей обмен метаболитами через мембрану митохондрии.

Спрогнозирована вероятность лактата оказывать ингибирующее действие на глиоксилат редуктазу, которая является частью глиоксилатного цикла, характерного для некоторых микроорганизмов и протекающего по редуцированной схеме цикла трикарбоновых кислот. Участие лактата в глиоксилатном цикле важно с эволюционной точки зрения: в раннем пребиотическом мире фиксирование углекислого газа в глиоксилат могло служить одним из первых способов образования лактата [M.I. Guzman, S.T.Martin, 2010]

Отмечена способность описываемого интермедиата с высокой степенью вероятности ингибировать ферменты рибулозо-фосфат-изомеразу (Pa 0,867), деоксиксилулозо-5-фосфат редуктоизомеразу (Pa 0,808), ксилулозоредуктазу (Pa 0,861). Эти ферменты осуществляют катализ реакций пентозо-

фосфатного пути, обеспечивая клетку пентозами для синтеза нуклеотидов и таких аминокислот как гистидин, триптофан, фенилаланин, тирозин, а также снабжая клетку НАДФН, который расходуется на синтетические нужды клетки (биосинтез жирных кислот, холестерина), обезвреживание ксенобиотиков и др.

Спрогнозирована роль лактата в синтетических процессах обмена углеводов: метаболит способен ингибировать ключевые ферменты глюконеогенеза – пируваткарбоксилазу (Pa 0,938), фосфоенолпируваткарбоксикиназу (Pa 0,800).

Предсказаны влияния лактата на метаболизм липидов, наиболее вероятно, посредством ингибирующего действия на ферментные пути. Указанный интермедиат способен ингибировать липопротеин липазу (Pa 0,858), ацил-СоА синтетазу (Pa 0,808), отвечающую за активацию жирных кислот и обеспечивающую их вступление в реакции этерификации в виде производных Со-А. Важно отметить возможность снижения активности фермента α -глицерофосфатдегидрогеназы (Pa 0,698), который является составной частью глицерофосфатной челночной системы, а также катализирует одну из первых ступеней глицеронеогенеза. Обращает на себя внимание участие описываемого метаболита в процессах синтеза стероидных гормонов посредством ингибирования тестостерон-17 β -дегидрогеназы (Pa 0,894), стероид-21-монооксигеназы (Pa 0,807), проопиомеланокортин превращающего фермента (Pa 0,908).

Таблица 3.1 – Прогнозируемые эффекты лактата на метаболизм углеводов
(P_a - вероятность проявления эффекта)

Название фермент	P_a	Тип действия
Пируваткарбоксилаза	0,938	И Н Г И Б И Р О В А Н И Е
Глиоксилатредуктаза	0,904	
Лактоназа	0,921	
Лактатдегидрогеназа	0,892	
Пируватдегидрогеназа	0,892	
Глюкозооксидаза	0,889	
Оксалоацетат тауомераза	0,881	
Оксоглутаратдекарбоксилаза	0,867	
Рибулозофосфатэпимераза	0,867	
Ксилулозоредуктаза	0,861	
Фосфоенолпируватмутаза	0,849	
Малатдегидрогеназа	0,808	
Деоксисилулозо-5-фосфат-редуктоизомераза	0,808	
Фосфоенолпируваткарбоксикиназа	0,800	
Аконитатдекарбоксилаза	0,796	
Оксалоацетатдекарбоксилаза	0,742	
Пируваткиназа	0,633	
Изоцитратлиаза	0,623	
Фумаратдегидрогеназа	0,579	
Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа	0,578	
Изоцитрат дегидрогеназа	0,564	
Триозофосфатизомераза	0,551	

Отмечена возможность лактата ингибировать обмен эйкозаноидов и простагландинов посредством угнетения активности простогландин-А1 изомеразы, модулировать цитокиновый ответ воздействием на лейкотриен-В4-20-монооксигеназу (Ра 0,768), а также проявляя свойства антагониста лейкотриена С (Ра 0,598). Изменение содержание лактата в ответ на выброс цитокинов было также отмечено и в научной литературе [M.L. Iwai, K.Jungermann, 1989].

Предсказана вероятность лактата оказывать влияния на обмен белков, аминокислот и нуклеотидов преимущественно за счет ингибирования ферментов: сериндегидрогеназы (Ра 0,886), аланинаминотрансферазы (Ра 0,830), триптофандиоксигеназы (Ра 0,821), фенилаланин-гистидин трансминазы (Ра 0,647), а также фермента, участвующего в обмене серосодержащих аминокислот – метилентетрагидрофолатредуктазы (Ра 0,884), фермента орнитинового цикла орнитинциклодезаминазы (Ра 0,693), фермента обмена нуклеиновых кислот нуклеозид оксидазы (Ра 0,585). Отметим, что лактат-аланиновый обменник между астроцитами и нейронами является частью протекторной системы глутамин-глутамат и помогает утилизировать токсичные молекулы аммиака, тем самым снижая последствия ишемии и оказывая протекторное действие на нейроны головного мозга [B.Voutsinos-Porche et al., 2003].

Спрогнозирована способность лактата принимать участие в обмене витамина А, с высокой вероятностью лактат ингибирует фермент ретиналь-оксидазу (Ра 0,915).

Обращает на себя внимание спектр активностей лактата, выходящих за рамки путей метаболизма: быть промотором инсулина (Ра 0,616); участвовать в сигнальных путях ингибируя G-протеин (Ра 0,887) и ферменты, обеспечивающие обмен инозитол-3-фосфата (Ра 0,715); модулировать передачу импульса в нервной системе будучи антагонистом нейротрансмиттеров (Ра 0,588) и GABA-рецепторов (Ра 0,686), а также являться агонистом фактора роста нервов (Ра 0,690); влиять на

чувствительность рецепторов фибриногена (Pa 0,802), тиреотропного гормона (Pa 0,566); быть агонистом TNF (Pa 0,608), макрофагального колониестимулирующего фактора (Pa 0,868) и синтеза интерферона (Pa 0,556), ингибировать активность комплемента (Pa 0,866), тем самым влияя на гуморальный и клеточный ответ при воспалительных процессах (рисунок 3.4).

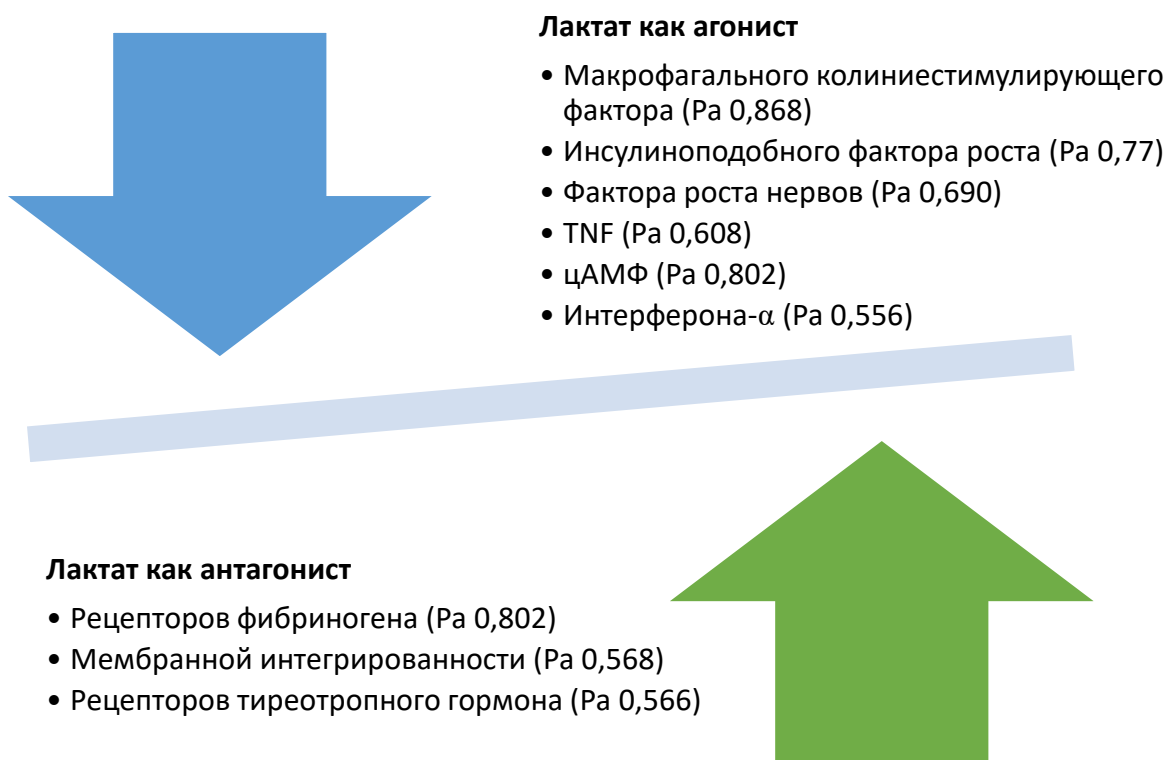


Рисунок 3.4 – Лактат как агонист и антагонист биологически активных эффектов (Pa – вероятность проявления действия)

Интересна способность лактата с высокой долей вероятности ингибировать N-ацетилгалактозаминидазу (Pa 0,902), которая катализирует превращение концевых фрагментов гликопептида А, представленного на мембранах эритроцитов А (II) и АВ (IV) групп крови. В следующих главах нами будут представлены результаты более подробного описания взаимодействия лактата с поверхностными антигенами эритроцитов человека.

3.2 Компьютерное моделирование потенциальных белковых партнеров лактата в среде STITCH

Изучение взаимодействий белок-метаболит долгое время отставало по количеству публикаций от исследований, посвященных взаимодействию белок-белок, белок-ДНК, белок-РНК (рисунок 3.5). Главная сложность долгое время заключалась в том, что не существовало единого некоммерческого регистра имеющихся данных, позволяющего ученым сверять данные своих экспериментов и вносить новые элементы в имеющуюся систему, что в некоторой степени объясняет малое количество публикаций по этой проблеме.

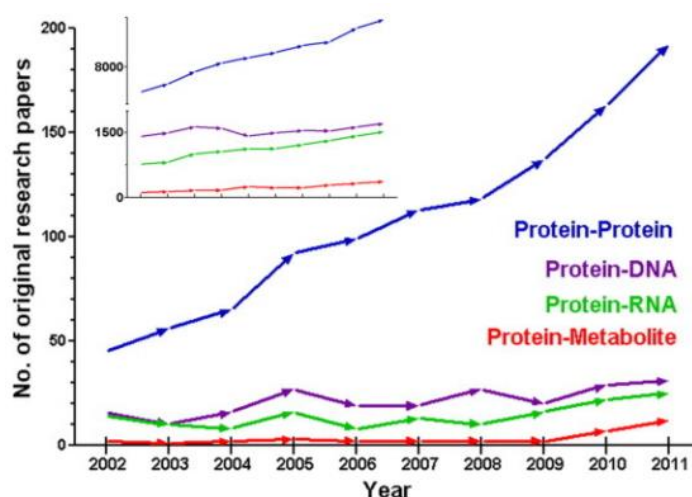


Рисунок 3.5 – График количества публикаций, посвященных взаимодействию белков с различными структурами. Красным цветом показано взаимодействие белок-метаболит [X.Li et al., 2013]

Однако, совместные усилия Европейской лаборатории молекулярной биологии (EMBL), центра исследования белков (CPR-NNF), университета Цюриха и Швейцарского института биоинформатики привело к созданию в 2008 году интегрированной базы данных взаимодействия малых молекул с белками – STITCH.

В период с 2008 по 2010 годы, количество химических соединений в базе возросло с 68 000 до 74 000, а количестве исследованных геномов увеличилось с 373 до 631 [M.Kuhn et al., 2008; M.Kuhn et al., 2010]. Сегодня

база содержит более 500000 химических субстанций, 2031 геномов и способна выстраивать 1,6 миллиардов различных взаимодействий [D.Szklarczyk et al., 2016].

Импорт химических субстанций в STITCH происходит из международной базы данных химических веществ – PubChem. Химические соединения формируют сеть, основанную на 4 типах связи: метаболические, литературные данные о взаимодействии, химически похожие структуры или проявляющие схожую активность. Чтобы определить, имеют ли два химических вещества схожую активность, используются данные из MeSH (Medical Subject Headings) и клеточную линию NCI60. Паттерн активности рассчитывается путем преобразования значений логарифма GI50 (концентрации, требуемой для ингибирования роста клеточной линии на 50%) в Z-баллы каждой клеточной линии NCI60, с последующим расчетом корреляции Пирсона. Такие вычисления позволяют пользователю сравнивать соединения с неизвестным механизмом действия с хорошо изученными соединениями.

Для того, чтобы связать полученные химические ассоциации с белковыми структурами, используется база данных PDB, для дополнительной информации о взаимодействии между протеинами и метаболитами также привлекаются базы KEGG, Reactome и другие.

Полученные данные STITCH представляются графически в виде сети связей различных типов между исследуемым веществом и различными белковыми структурами. Связи могут быть активирующими, ингибирующими, также возможно прямое связывание, катализ и некоторые другие биохимические превращения. Во избежание зрительного утяжеления представленной сети взаимосвязей выводятся только наиболее статистически вероятные активности. При этом, пользователь сам может выбирать степень достоверности представленных результатов: высочайшая уверенность (highest confidence) >0,9; высокая уверенность (high confidence) >0,7; средняя

уверенность (medium confidence) $>0,4$; низкая уверенность (low confidence) $>1,5$.

Таким образом, STITCH связывает данные о молекулярном строении, клеточном расположении малых молекул и позволяют проанализировать и визуализировать полученные взаимосвязи с белками.

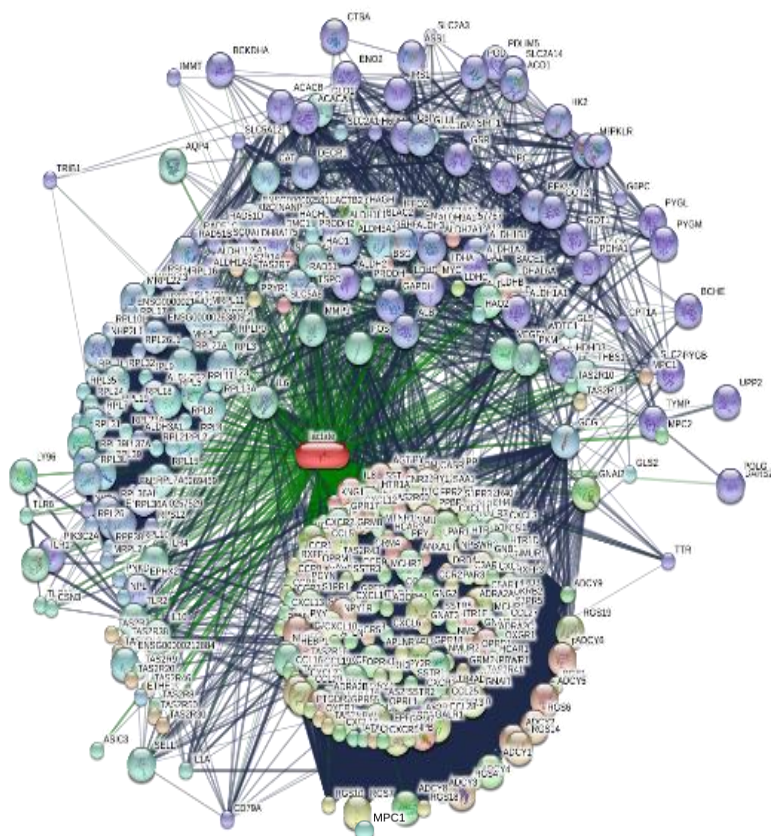
Нами было произведено моделирование взаимодействия лактата с белковыми структурами в программе STITCH версии 5.0 (2016). Мы выбрали взаимосвязи, для которых вероятность взаимодействия (P_a) составила больше 0,5 (таблица 3.2). Количество таких взаимодействий составило 367, среди которых были отмечены связи с ферментами, гормонами, белками-транспортерами, рецепторами. На основании возможных взаимодействий строилась графическая модель, отражающая отношения между белками и анализируемым субстратом (рисунок 3.6).

Анализ данных компьютерного эксперимента показал, что полученные результаты сопоставимы с таковыми при моделировании в программе PASS.

Нами была отмечена высокая вероятность лактата взаимодействовать с белками различных транспортных систем: семейством растворимых белков-переносчиков (P_a 0,994), митохондриальным переносчиком пирувата (P_a 0,900), аквапоринами (P_a 0,828). Нельзя не отметить и то, что лактат может связываться с альбумином (P_a 0,594) – основным транспортным белком крови человека.

Интересно, что лактат способен являться лигандами многих рецепторов, в числе которых HCAR1 (P_a 0,986) и HCAR3 (P_a 0,900). Связываясь с названными рецепторами исследуемый интермедиат способен оказывать липолитический эффект через промежуточную активацию G-белка. Кроме этого, лактат, вероятно, может проявлять сродство к мускариновым холинэргическим рецепторам (P_a 0,900), тем самым опосредуя ингибирование аденилатциклазного, инозитол-3-фосфатного путей передачи сигнала.

А



Б

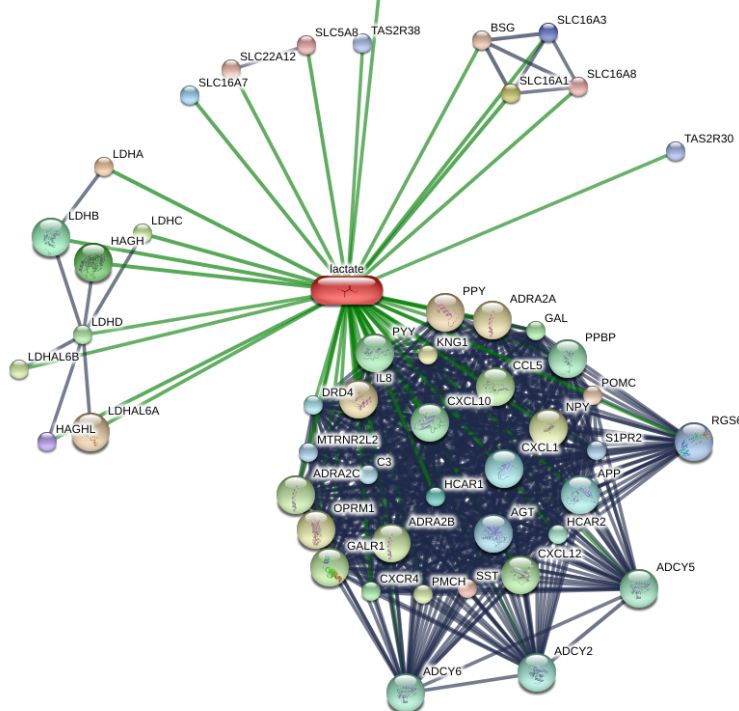


Рисунок 3.6 – Карта предсказанных взаимодействий лактата с белковыми структурами (STITCH 2016). А. Взаимодействия, для которых $P_a > 0,5$. Б. Взаимодействия, для которых $P_a > 0,9$.

Также выбранный метаболит способен с одинаковой и неизменно высокой степенью вероятности вступать во взаимодействие с дофаминовыми, серотониновыми и глутаматными рецепторами (Pa 0,900), что говорит об активности лактата в отношении процессов передачи нервного импульса и позволяет выдвинуть предположение о том, что данный интермедиат является важной частью микроокружения нейронов и выполняет множество неметаболических функций в центральной нервной системе. В поддержку выдвинутого предположения приведем работы группы ученых [F.Tang et al., 2014], которые показали, что лактат является не только энергетическим субстратом астроцитов, но и выполняет роль трансмиттера. Высокое его содержание было зарегистрировано в клетках locus coeruleus ствола мозга. Работа других ученых вносит вклад в понимание роли лактата в обеспечении синаптической пластичности мозга посредством активирования таких генов, как Arc, c-Fos, и Zif268, долгосрочными эффектами активации названных генов являются улучшение памяти и когнитивных функций [J.Yang et al., 2013].

Обсуждается роль лактата как нейропротективного фактора (Pa 0,900). Предполагается, что, связываясь с белком MTRNR2L2, метаболит снижает образование преамилоидного пептида, тем самым уменьшая активность нейродегенеративных процессов. Отметим, что амилоидная теория развития таких заболеваний как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера сегодня занимает ведущую позицию [A.I.Clark et al., 2015].

Отмечена возможность лактата взаимодействовать с ангиотензиногеном (Pa 0,907) и сосудистым эндотелиальным фактором роста (Pa 0,879), белковыми структурами, участвующими в поддержании сосудистого тонуса.

В работе D.K.Gardner (2015) показана эссенциальная роль лактата в процессе инвазии бластоцисты. Лактат не только создает закисленную среду, способствующую активации протеаз и облегчающих инвазию, но и является сигнальной молекулой, активирующей эндотелиальный сосудистый фактор и запускающей процессы ангиогенеза.

Таблица 3.2 – Предсказанные взаимодействия лактата с белковыми структурами ($P_a > 0,9$).

Белок	Вероятность взаимодействия	Пояснительный текст
Лактатдегидрогеназа	0,998	Фермент, осуществляет обратимый катализ пирувата в лактат
SLC16A1	0,994	Семейство растворимых белков-переносчиков. Отвечают за быстрый транспорт веществ через мембрану.
SLC16A7	0,969	
SLC16A3	0,969	
SLC5A8	0,954	
SLC16A8	0,943	
SLC22A12	0,935	Растворимый белок переносчик. Регулирует абсорбцию и выведение уратов, расположен в почках.
HCAR1	0,986	Выполняет роль рецептора для L-лактата, опосредует антилиполитический эффект через G-белок.
Соматостатин	0,936	Гормон белковой природы, подавляет секрецию гормонов гипофизом, обладает

		ингибирующим действием на гормонально активные пептиды желудочно-кишечного тракта
Проопиомеланокортин	0,931	Прогормон передней доли гипофиза, не проявляет гормональной активности
Панкреатический полипептид	0,927	Снижает секрецию сока поджелудочной железы, усиливает образование желудочного сока
Интерлейкин-8	0,924	Провоспалительный хемокин
α -адренорецепторы	0,922	Разновидность адренорецепторов
Кининоген	0,921	Ингибитор тиоловой протеазы, участвует в коагуляционном каскаде
Опиодные рецепторы	0,917	Рецепторы нервной системы
Нейропептид Y	0,916	Отвечает за чувство насыщения, регулирует уровень гастроинтестинальной секреции
GALR1	0,913	Ингибитор аденилатциклазы
CCL5	0,910	Опосредует хемотаксис

		моноцитов, Т-хелперов, эозинофилов.
CXCR4	0,909	Рецептор, участвующий в переносе сигнала посредством увеличения внутриклеточного кальция.
Пептид YY	0,909	Ингибирует экзокринную панкреатическую секрецию, кишечную моторику
PPBP	0,909	Стимулирует синтез ДНК, митоз, гликолиз, синтез простагландина E2, синтез гиалуроновой кислоты и гликозаминогликанов
Аденилатциклаза	0,908	Вторичный посредник передачи сигнала в клетку
MPC1	0,908	Митохондриальный переносчик пирувата
APP	0,908	Предшественник амилоидного белка
DRD4	0,917	Рецептор дофамина
Ангиотензиноген	0,907	Предшественник ангиотензина, мощного вазопрессора

С3 компонент комплемента	0,907	Опосредует реакции иммунной защиты
MTRNR2L2	0,900	Нейропротективный фактор, подавляет апоптоз клеток и секрецию APP, увеличивает активность фагоцитов в отношении APP
SIRP2	0,900	Рецептор сфингозина
RGS6	0,900	Регулятор G белка

Обращает на себя внимание предсказанная возможность лактата взаимодействовать с гормонами и гормоноподобными субстанциями. С гормонами белковой структуры лактат взаимодействует непосредственно (соматостатин (Pa 0,900), глюкагон (Pa 0,638)). С гормонами, обладающими липидной структурой, лактат взаимодействует по рецептор-опосредованному механизму, например, рецептор эйкозаноидов первого типа (OXE 1) и рецептор простагландина E (Pa 0,900).

Неожиданно низкая активность показана программой STITCH в отношении некоторых ферментов – глутаминаза (Pa 0,690), каталаза (Pa 0,655), глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа (Pa 0,549), аспаратаминотрансфераза (Pa 0,547), в то время как для мышечной изоформы пируват киназы (Pa 0,898) и глиоксилазы (Pa 0,717) отмечаются высокие показатели.

Спрогнозирована высокая вероятность лактата влиять на иммунные и воспалительные процессы, что также было предсказано программой PASS. Однако, использование инструментов программы STITCH позволяет предположить нам другие пути проявления данных эффектов.

Исследуемый интермедиат способен связываться с CNR2 рецепторами макрофагов (P_a 0,900) и ингибировать активность аденилатциклазы. Взаимодействие с интерлейкин-10 (P_a 0,851) может приводить к ингибированию субстанций, выделяемых активированными макрофагами и Т-хелперами. Также показана возможность являться лигандом хемокинов CCL25 и CXCL11 (P_a 0,900), которые отвечают за развитие и дифференцировку Т-клеточной линии.

Известно, что функции лимфоцитов зависят от микроокружения. Так, при большом количестве лактата происходит потеря функции Т-клеток, в то время как активность макрофагов нарастает [S.Y.C. Choi et al., 2013].

Также отмечена вероятность лактата взаимодействовать с рецепторами семейства TOLL (P_a 0,844), которые отвечают за антибактериальный ответ, причем с равной степенью вероятности спрогнозирована активность лактата как в отношении грамположительных, так и грамотрицательных бактерий.

Представлена возможность исследуемого интермедиата взаимодействовать с белками комплемента (P_a 0,900), что опосредует дегрануляцию и реакции окислительного стресса.

Интересна способность взаимодействовать с основными защитными ферментами бактерий – бета-лактамазами (P_a 0,628), что расширяет горизонты в понимании антибактериальных эффектов малых молекул.

Использование программ компьютерного моделирования носит не только вспомогательный характер и помогает выделить наиболее вероятные и значимые эффекты и связи с другими молекулами, но и само является источником большого количества информации, позволяя систематизировать уже накопленные знания по исследуемому вопросу. Полученные в результате проведенных компьютерных экспериментов данные позволяют нам сделать вывод о важности и необходимости привлечения электронных ресурсов для моделирования и планирования дальнейшей исследовательской работы, поскольку только в эксперименте мы можем подтвердить или опровергнуть смоделированные эффекты.

Проведенный анализ прогнозируемых активностей лактата в программе PASS позволил нам сформировать целостное представление о множественных и разнонаправленных метаболических и регуляторных эффектах описываемого метаболита. Лактат проявляет себя как интермедиат-регулятор различных видов обмена (углеводного, липидного, аминокислотного), как координатор витальных функций в организме человека – синтез и рилизинг гормонов, модулирование рецепторного ответа, иммуновоспалительных реакций, а также обладает потенциальным противоопухолевым действием. Результаты моделирования в среде STITCH выявили большое количество белков-кандидатов, вероятность взаимодействия с которыми, по данным прогноза, достаточно велика, среди них белки, обладающие нейропротекторным действием, рецепторы гормонов, ферменты и др.

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 взаимодействий типа белок-белок, 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.

ГЛАВА 4.

ВЛИЯНИЕ ЛАКТАТА НА БЕЛОК-БЕЛКОВОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ

4.1 Характеристика лактатдегидрогеназной каталитической системы в зависимости от групповой принадлежности крови по системе АВ0

Лактат представляет собой малую молекулу, активно участвующую в различных процессах как внутри, так и вне клетки. В настоящее время активно изучается влияние лактата как сигнальной молекулы и трансмиттера на многие метаболические пути и рецепторные комплексы, однако, немного известно о лигандной роли лактата во взаимодействиях типа белок-белок. Спрогнозированные с помощью методов *in silico* эффекты лактата свидетельствуют о потенциальной возможности этого интермедиата являться лигандом в белок-белковых взаимодействиях, в частности антиген-антительных.

Предварительно проводилось изучение лактатдегидрогеназной каталитической системы у здоровых добровольцев: измеряли содержание лактата, пирувата, оценивали активность лактатдегидрогеназы, рассчитывали коэффициент лактат/пируват в зависимости от групповой принадлежности крови по системе АВ0 (таблица 4.1).

Система групп крови АВ0 выбрана в качестве модельной среды не случайно. В ранее проводимом исследовании нами было показано наличие изменений гемостазиологических показателей, а также клеточного состава крови взаимосвязанных с определенной группой крови [О.А.Гусякова и соавт., 2019].

При оценке содержания лактата обращает на себя внимание, что наибольшее значение этого показателя характерно для 0 (I) и В (III) групп крови - $2,26 \pm 0,15$ ммоль/л и $2,27 \pm 0,14$ ммоль/л соответственно, что превосходит полученные средние показатели в генеральной совокупности $2,15 \pm 0,07$ ммоль/л, но остается в границе референсных пределов (0,2-2,4

ммоль/л [А.А.Кишкун, 2007]). Содержание лактата в крови лиц с А (II) и АВ (IV) группами крови оказалось ниже, чем в генеральной совокупности - $2,02 \pm 0,12$ ммоль/л и $2,01 \pm 0,18$ соответственно.

Таблица 4.1 – Лактатдегидрогеназная каталитическая система здоровых добровольцев в зависимости от групповой принадлежности крови по системе АВ0 (n=446)

		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

Содержание пирувата также, как и лактата, было наибольшим в группе лиц с 0 (I) и B (III) группами крови: $0,053\pm 0,002$ ммоль/л и $0,053\pm 0,002$ ммоль/л. Наименьшее содержание пирувата зарегистрировали у обладателей АВ (IV) группы крови $0,047\pm 0,002$ ммоль/л. Отметим, что принятые границы физиологического содержания пирувата составляют 0,041 – 0,067 ммоль/л [В.Хейль и соавт., 2001].

Нами был произведен расчет коэффициента лактат/пируват для исследуемой группы (рисунок 4.1). Установлено, что для генеральной совокупности этот коэффициент составил $43,91\pm 2,02$. Наибольшее значение соотношения метаболитов было зарегистрировано у лиц с 0 (I) группой крови и составило $48,23\pm 6,02$. Напомним, что для этой группы лиц было характерно наивысшее содержание лактата и пирувата. Наименьшее соотношение лактата и пирувата было выявлено среди лиц с А (II) группой крови и составило $40,67\pm 1,96$.

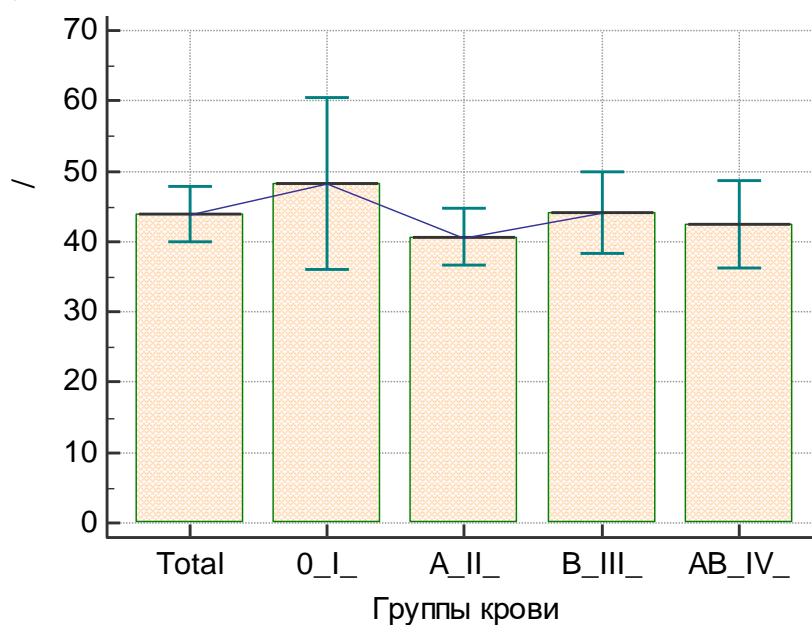


Рисунок 4.1 – Соотношение лактата и пирувата в зависимости от групповой принадлежности крови по системе АВ0

Лактатдегидрогеназа является ключевым компонентом, связывающим превращения лактата и пирувата и опосредующим работу каталитической лактатдегидрогеназной системы. Физиологическими принято считать значения активности фермента в диапазоне до 480 Е/л [Л.А.Данилова, 2003]. Наибольшая активность лактатдегидрогеназы была установлена в группе людей с В (III) группой крови и составила $393,79 \pm 18,41$ Е/л, в этой же группе наблюдалось наибольшее содержание лактата и пирувата. Вероятно, активность лактатдегидрогеназы несколько выше, чем в среднем по генеральной совокупности способствует эффективному использованию метаболических субстратов в энергетических целях и поддержанию каталитической системы в оптимальном функциональном состоянии.

Наименьшая активность лактатдегидрогеназы наблюдалась в группе лиц с 0 (I) группой крови и составила $364,22 \pm 18,12$ Е/л, в этой же группе лиц было отмечено повышенное относительно генеральной совокупности содержание лактата и пирувата. Данный факт свидетельствует о более низком уровне использования описываемых метаболитов каталитической системой, что, вероятно, может свидетельствовать о их намеренном сохранении для пластических процессов, таких как глюконеогенез, превращение в аминокислоты, участие в построении молекул белка и др.

Таким образом, мы видим, что обладатели различных групп крови по системе АВ0 являются гетерогенными в отношении исследуемых метаболических показателей. Присутствие такой биологической вариабельности по содержанию лактата, пирувата, активности лактатдегидрогеназы показывает, насколько чувствительной и неоднородной является система групп крови АВ0. Можно предположить, что введение нового компонента в эту систему, например, низкомолекулярного лиганда будет вызывать изменение в ее функционировании, доступные для детекции, что делает систему групп крови АВ0 перспективной платформой для проведения модельных экспериментов.

4.2 Влияние лактата на антиген-антительное взаимодействие на примере модельной системы групп крови АВ0

4.2.1 Влияние лактата на гликопротеины А и В

Для проверки гипотезы о влиянии лактата на комплекс антиген-антитело нами была проведена серия модельных экспериментов. В качестве объекта исследования использовали антигены А и В групп крови по системе АВ0. Эксперименты по изучению влияния лактата включали измерение времени начала агглютинации эритроцитов, оценку степени агглютинации естественных и моноклональных антител плазмы крови, а также характер воздействия на время начала агглютинации моноклональных антител с эритроцитами. Эритроциты А(II) и В (III) групп крови преинкубировались с лактатом в конечной концентрации 2 мМ, аналогичная постановка повторялась при проведении экспериментов с естественными (анти-А и анти-В) и моноклональными антителами.

Несмотря на то, что открытие групп крови было совершено в 1901 годах Карлом Ландштейнером, изучение особенностей строения и функционирования данных антигенов представляет собой актуальную задачу и на сегодняшний день.

Существует мнение о взаимосвязи групповой принадлежности крови на и ряда заболеваний. Например, *H. pylori* ассоциированный гастрит более часто возникает у лиц с А (II) группой крови [S.M.Jaff, 2011], а сама бактерия использует антигенную детерминанту в качестве лиганда, что фасилитирует ее прикрепление к слизистой оболочке желудка и двенадцатиперстной кишки [C.C.Brandão de Mattos et al., 2017]. Интересно, что антиген А служит лигандом и для ротавирусной инфекции [X.Sun, 2018]. Всё это объясняет неустойчивый иммунитет по отношению к бактериальным и вирусным инфекциям у лиц, имеющих А (II) группу крови.

Риск ухудшения состояния сердечно-сосудистой системы с исходом в артериальную гипертензию и ишемическую болезнь сердца ниже у лиц с 0 (I)

группой крови, что связывают с неактивностью гликозилтрансфераз, но для лиц с группами крови А (II) и В(III) данный риск существенно повышен, поскольку указанные антигены способны взаимодействовать с фактором Виллебранда и VIII фактором свертывания, а также с целым рядом биологически активных субстанций, приводя к изменению реологических свойств крови [Ф.Н. Гильмиярова и соавт., 2007; Н. Zhang et al., 2012].

Также отмечено наличие взаимосвязи с частотой развития онкологических заболеваний: у носители А (II) группы крови более часто возникают опухоли груди, колоректальной области, яичников [G.D.Cozzi et al., 2017], а у носителей В (III) группы крови – опухоли пищевода и легких; лица, имеющие 0(I) группу крови имеют наименьший риск развития онкологических заболеваний[S.K Rummel, R.E.Ellsworth, 2016].

При анализе причин мужского бесплодия было также исследовано распределение по принадлежности группы крови. Отмечено, что мужчины, имеющие 0 (I) группу крови более часто страдают бесплодием и имеют более высокую концентрацию антиспермальных антител, в сравнении с мужчинами, имеющими другие группы крови [E.Abdollahi et al., 2014].

Недавно проведенное исследование групповой принадлежности крови среди населения Тибета показало, что наибольшее количество жителей имеет В (III) и 0 (I) группу крови, которые являются самыми стабильными в отношении метаболических нарушений и инфекционных заболеваний [Y.Zhonghua et al., 2017].

Приведенные данные свидетельствуют о том, что антигены А и В не являются инертными структурами, а способны активно вступать во взаимодействия с биологически активными веществами и влиять на различные процессы, протекающие в организме человека.

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 (таблица 4.2).

Установлено, что введение лактата в экспериментальную систему приводит к замедлению начала вступления антигенов А и В в реакции агглютинации. Причем 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%.

Различия, проявляемые во времени начала агглютинации, для антигенов А и В можно объяснить отличием их структуры (рисунок 4.2).

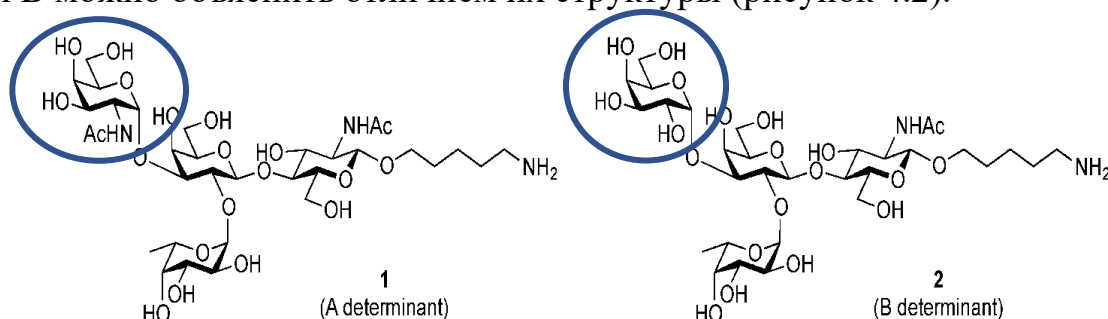


Рисунок 4.2 – Строение антигенных детерминант А и В [А.Нара et al., 2014]

Основой построения антигена А и В является антиген-Н, который имеет строение - Fuc α 1->2Gal-. К антигену Н посредством А- и В-трансфераз с образованием α -1,3 – гликозидной связи достраиваются моносахариды N-ацетилгалактозамин и D-галактоза соответственно, что и обеспечивает формирование конечных антигенных структур. Антиген А и антиген В можно представить как GalNAc α 1->3(Fuc α 1->2)Gal- и Gal α 1->3(Fuc α 1->2)Gal- [F.Yamamoto et al., 1993; F.Yamamoto et al., 2014]. Очевидно, лактат проявляет большее сродство к антигенной детерминанте А, что также было предсказано методами компьютерного моделирования в программе PASS.

Таблица 4.2 – Влияние лактата на скорость начала образования комплексов антиген-антитело с антигенами А и В (время начала агглютинации, с.)

	Статистический показатель (n=30)			
	M±m	Me	Δ%	P
АНТИГЕН А				
Контроль антиген А А (II)	6,0±0,1	5,9	-	
Антиген А А(II)	8,5±0,16	8,0	+41,6	p<0,001
Контроль антиген А АВ (IV)	6±0,1	6	-	
Антиген А АВ(IV)	9,0±0,21	9	-+50	p<0,01
АНТИГЕН В				
Контроль антиген В В(III)	6±0,1	6,0	-	
Антиген В В(III)	7,0±0,22	7,0	+16,6	p<0,001
Контроль антиген В АВ(IV)	6±0,1	6	-	
Антиген В АВ(IV)	8,0±0,25	8	+33,3	p<0,001

В пользу того, что биологически активные вещества могут влиять на скорость агглютинации эритроцитов, свидетельствует работа, посвященная изучению влияния ацетилхолина на процессы агглютинации [А.И.Стрельникова и соавт., 2013]. Показано, что скорость агглютинации эритроцитов меняется под воздействием ацетилхолина неоднозначно и в группе женщин зависит от множества параметров, в том числе фазы менструального цикла. Другое исследование посвящено изучению влияния адреналина на скорость агглютинации эритроцитов, при этом показано, что у мужчин и небеременных женщин его введение приводит к повышению скорости агглютинации, у беременных женщин адреналин не вызывает изменения в процессах агглютинации, а у рожениц – повышает [А.И.Володченко и соавт., 2011; В.И.Циркин и соавт., 2008]. Также отмечено влияние прогестерона и эстрогена на скорость агглютинации эритроцитов [В.И.Циркин и соавт., 2015].

Кроме того, высказано предположение, что эритроциты представляют собой универсальную систему для экспериментов, поскольку на их мембране представлено большое количество различных рецепторов. Поэтому изучение реакции эритроцитов на экзогенное введение того или иного вещества ведет к пониманию ответной реакции на исследуемое вещество и в других органах и тканях [Р.И.Стрюк, И.Г.Длусская, 2003].

4.2.2 Влияние лактата на естественные антитела

Далее мы исследовали влияние лактата на естественные антитела плазмы крови (таблица 4.3). При оценке степени агглютинации естественных антител с выбранным интермедиатом было отмечено, что выраженность агглютинации в комплексах с анти-А и анти-В антителами снижалась. Отметим, что анти-В антитело в данном эксперименте показало большую чувствительность к введению лактата: степень агглютинации уменьшилась на 62,5% в сравнении с контролем и составила 3 pt по W.Marsh, контроль – 8 pt.

Таблица 4.3 – Оценка влияния лактата на естественные антитела плазмы крови (степень агглютинации, pt)

Статистич. показатель (n=30)	Контроль анти-А антитела	Анти-А антитела	Контроль анти-В антитела	Анти-В Антитела
M±m	10	5,0±0,34	8	3,0±0,43
Me	10	5,5	8	3
Δ%	-	- 50	-	- 62,5
p	-	p<0,001		p<0,001

Понятие естественные антитела впервые было введено ученым S.V.Boyden, который определял этим словом фракции глобулинов практически здоровых неиммунизированных организмов [S.V.Boyden, 1966].

На сегодняшний день известно, что большинство естественных антител направлено на взаимодействия с гликанами и по характеру взаимодействия мы можем разделить их на три группы: консервативные антитела, т.е. общие для большинства живых здоровых организмов; аллоантитела, специфичные по отношению к группоспецифическим антигенам эритроцитов; 3)пластичные антитела, относящиеся к обоим группам, за тем исключением, что их появление связывается с некоторыми патологическими или физиологическими состояниями (воспаление, беременность) [Н.В.Бовин, 2013].

За синтез естественных антител ответственна популяция длительно живущих CD5+ клеток В-1 клеток, на которую приходится порядка 30% от общего пула. Интересно отметить, что набор естественных антител и их активности однотипны не только для организмов одного вида, но также мало отличаются среди организмов разных видов [J.George, Y.Shoenfeld, 1996].

Естественные антитела представляют собой консервативную, тонко регулируемую, многофункциональную систему, широко представленную в организме человека. Существует гипотеза, согласно которой иммунологический гомеостаз есть равновесие между естественными антителами и их мишенями [S. Avrameas, T. Ternynck, 1995].

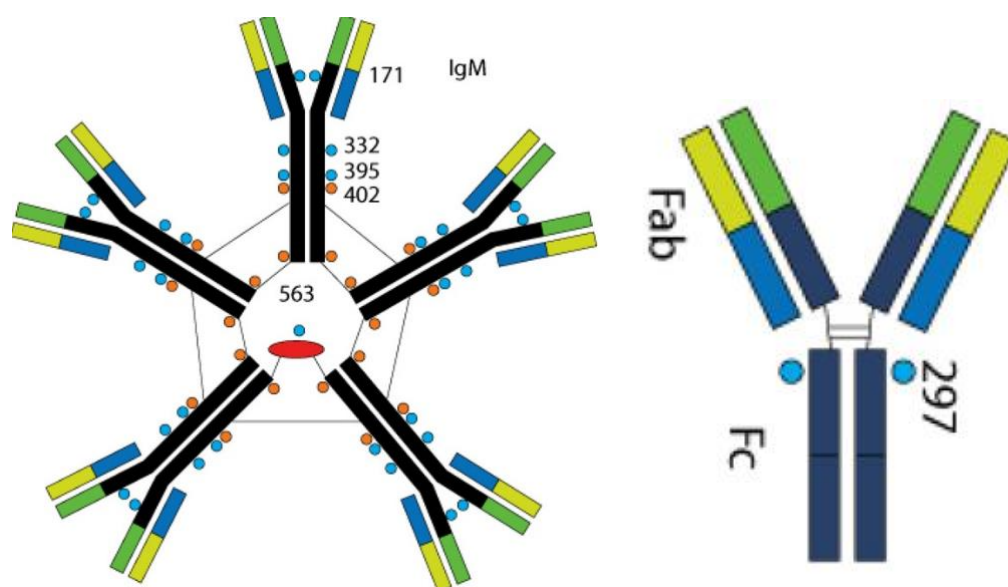


Рисунок 4.3 – Строение иммуноглобулинов класса G (слева) и M (справа) [по R.Müller et al., 2013]

Антитела к антигенам эритроцитов представляют собой IgG или IgM. В человеческом организме представлено 33 группы крови, самые известные из которых ABO, Kell, Lewis и т.д. (рисунок 4.3) [R.Mitra et al., 2014]. Отсутствие какого-либо антигена из этих систем сопровождается продукцией антитела к данному антигену.

Среди естественных антител IgM доминируют, достигая порядка 80%. Антиэритроцитарные естественные антитела составляют около 5% от общего количества IgM, синтезированного в организме. Также интересно отметить, что эпитопная специфичность анти-А антитела шире, чем анти-В антитела [Н.В.Бовин, 2013].

IgM – первое антитело, которое продуцируется организмом в рамках гуморального иммунного ответа, мономер этого антитела обладает низкой

аффинностью. Для того, чтобы скомпенсировать недостаточную способность связывания антигенов, мономеры IgM объединяются в более крупные структуры, формируя пентамеры. Антиген связывающий участок (Fab) является общим для всех типов иммуноглобулинов, в отличие от фрагмента Fc. Этот фрагмент у IgM состоит из трех доменов C μ 2, C μ 3 и C μ 4, а также C-концевой участок. Мономеры IgM состоят из двух тяжелых (μ) и двух легких (L) цепей. В присутствии J цепи IgM представляет собой пентамер (μ 2L2)5J, в ее отсутствии – гексамер (μ 2L2)6. Тяжелые цепи ковалентно связаны сульфидными мостиками в указанные домены [R.Müller et al., 2013].

Примечательно, что наравне с иммунными функциями описываемые антитела проявляют целый ряд других характеристик. В качестве примера приведем транспортную функцию естественных антител. Они участвуют в элиминации альбумина, фибриногена, тромбина и некоторых других соединений [N.Baumgarth et al., 2005]. Образование комплексов между естественными антителами и антигеном при участии анти-Gal α 1-3Gal IgG приводит к удалению стареющих эритроцитов. Посредством связывания с эпитопами или другими доступными участками, естественные антитела способны менять форму иммунных комплексов и способствовать их клиренсу [М.А.Мягкова, В.С. Морозова, 2014].

Однако, стоит отметить, что аффинность естественных антител уступает таковым свойствам адаптивных антител, что сказывается на их эффективности.

Отмечена способность описываемых антител взаимодействовать со структурами белковой природы (цитокины, инсулин). В этих взаимодействиях антитела выполняют защитную роль, оберегая пептиды от агрессии протеолитических ферментов, а также выступают в качестве транспортных элементов, доставляя белки до места наибольшей аффинности связывания, избегая тем самым множество низко специфичных взаимодействий [А.Б.Полетаев, 2008; J.Vani et al., 2008].

4.2.3 Влияние лактата на моноклональные антитела

Исследование влияния лактата на моноклональные антитела стало следующим этапом данного эксперимента. После инкубации моноклональных антител с лактатом мы оценивали степень агглютинации по шкале баллов W.Marsh (таблица 4.3) и влияние лактата на время начала агглютинации (таблица 4.4).

Полученные результаты показали, что внесение лактата на этапе инкубации способно замедлять процессы агглютинации. Причем как для моноклонального анти-А антитела, так и для анти-В антитела степень агглютинации изменялась одинаково – изменения составили 75% в сравнении с группой контроля.

При анализе данных, полученных после измерения времени начала агглютинации с использованием моноклональных антител, инкубированных с лактатом, было отмечено существенное замедление процесса агглютинации. С моноклональными анти-А антителами реакция протекала в 18 раз медленнее по сравнению с контролем, а с моноклональными анти-В антителами - в 15 раз медленнее.

Отметим, что реакция между антигеном и антителом протекает в две фазы. Первая фаза – специфическое взаимодействие - определяется точностью совпадения паратопа (антигенсвязывающего участка антитела) с эпитопом антигена и протекает очень быстро. В момент специфического связывания необходимо преодолеть отталкивание, которое возникает между антигеном и антителом. Когда расстояние между эпитопом и паратопом достигает нескольких нанометров, то притяжение происходит за счет ионных и гидрофобных связей. Эти связи на локальном уровне способствуют вытеснению молекул воды, что обеспечивает еще большее сближение эпитопа и паратопа. Затем притяжение между антигеном и антителом обеспечивается силами Ван-дер-Ваальса, а успешность взаимодействия зависит от плотности установления паратопа антитела по отношению к

эпитопу антигена, поскольку возникающие в этот момент силы притяжения не сильны [J.D.Watson et al., 2004].

Вторая фаза – неспецифического взаимодействия – протекает более медленно, зависит от присутствия и концентрации различных электролитов. Именно результатом второй фазы взаимодействия является видимая на глаз агглютинация.

Таблица 4.3 – Оценка влияния лактата на моноклональные антитела (степень агглютинации, pt).

	Статистический показатель (n=30)			
	M±m	M e	Δ %	P
АНТИ-А АНТИТЕЛО				
Контроль анти-А антитело А (II)	12	1 2		
Анти-А антитело А(II)	3,0 ±0,38	3	75 ⁻	p<0,001
Контроль анти-А антитело AB (IV)	12	1 2		
Анти-А антитело AB(IV)	3,0 ±0,39	3	75 ⁻	p<0,001
АНТИ-В АНТИТЕЛО				
Контроль анти-В антитело B(III)	12	1 2		
Анти-В антитело B(III)	3,0±0,41	3	75 ⁻	p<0,001
Контроль анти-В антитело AB(IV)	12	1 2		
Анти-В антитело AB(IV)	3,0±0,43	3	75 ⁻	p<0,001

Следует отметить, что полнота протекания реакции антиген-антитело зависит от большого количества факторов, которые необходимо учитывать при проведении эксперимента (рисунок 4.3).

Таблица 4.4 – Оценка влияния лактата на моноклональные антитела (время начала агглютинации, с)

	Статистический показатель (n=30)			
	M±m	M e	Δ %	P
АНТИ-А АНТИТЕЛО				
Контроль анти-А антитело А (II)	6,0±0,03	6		
Анти-А антитело А(II)	115,5 ±1,38	1 09,3	+1 825	p<0, 001
Контроль анти-А антитело AB (IV)	6,0±0,03	6		
Анти-А антитело AB(IV)	112,5 ±2,81	1 15,9	+1 175	p<0, 001
АНТИ-В АНТИТЕЛО				
Контроль анти-В антитело B(III)	6,0±0,04	6		
Анти-В антитело B(III)	88,5±1,97	9 0,7	+1 375	p<0, 001
Контроль анти-В антитело AB(IV)	6,0±0,04	6		
Анти-В антитело AB(IV)	88,5±1,76	9 1,4	+1 375	p<0, 001

В одном из исследований были определены оптимальные условия для определения антиэритроцитарных антител, которые включили в себя: инкубацию при очень низкой ионной силе (I = 0,03-0,04) или в присутствии полиэтиленгликоля, продолжительность инкубации должна составлять не

менее 20 минут, соотношение сыворотка/клетки должно быть максимальным, количество эритроцитов должно быть минимальным, эритроциты должны быть гомозиготными [R.Reverberi, L.Reverberi, 2007).

Моноклональные антитела, использованные нами в эксперименте, представляют собой антитела, которые вырабатываются иммунными клетками, полученными из одной клетки-предшественницы. Получение их впервые стало возможно благодаря гибридомному методу, разработанному в 1975 году учеными Ж.Кёлером и С.Мильштейном [G. Kohler, C. Milstein, 1975].

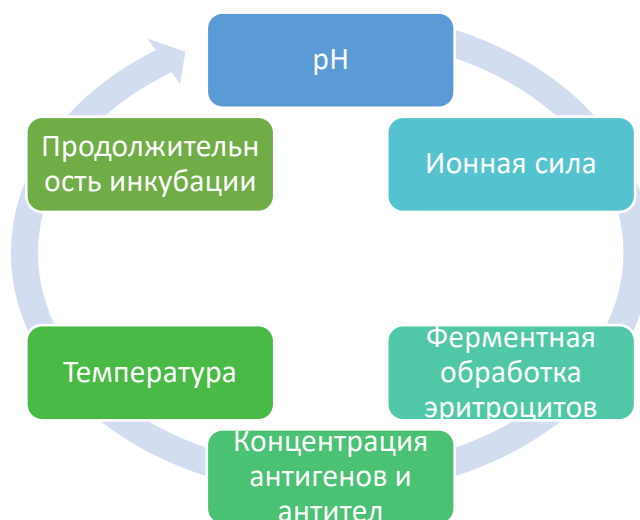


Рисунок 4.3 – Факторы, влияющие на взаимодействие антиген-антитело [по R.Reverberi, L.Reverberi, 2007]

Суть метода заключалась в создании гибридомы – соматического гибрида клеток миеломной линии и антителопродуцирующих клеток. У мышей, сенсibilизированных определенным антигеном, производили выделение антителопродуцирующих клеток селезенки, после чего соединяли полученные клетки с клетками миеломы.

Таким образом, синтезированные гибридомой антитела получали сразу два важных свойства – возможность неограниченного деления и специфичность, которая определялась на этапе сенсibilизации к антигену.

Очень скоро после открытия, моноклональные антитела вышли на рынок фармацевтических препаратов и стали пользоваться широким спросом. Их применение возможно для детекции определенного антигена и для последующей его элиминации. Безусловно, применение моноклональных антител стало важной вехой в лечении онкологических и аутоиммунных заболеваний [L.J.Geskin, 2015].

Однако, на современном этапе наука стремится к получению антител с наивысшей возможностью связывания, для этого необходимо минимизировать участки нечеловеческой ДНК. Работа в данном направлении привела к созданию химерных, гуманизированных и полностью человеческих моноклональных антител [J.K. Liu, 2014].

Для этих целей стал применяться метод «фагового дисплея», который основан на представлении пептидов или фрагментов белка на поверхности фагов. Принцип данного метода заключается в слиянии генов, кодирующих определённые белки с геном, кодирующим структурные белки фагов. Имеющиеся и синтезированные белки хранятся в специализированных библиотеках, что сокращает время подбора необходимых пептидов по аффинности и назначению [N.Clementi et al., 2012].

Не вызывает сомнений, что моноклональные антитела представляют собой точный научный инструмент, который в настоящее время используется и для исследования фундаментальных процессов, и в интересах практической медицины.

Проведенная нами серия экспериментов позволяет предположить, что малые молекулы на примере лактата способны изменять специфические взаимодействия антиген-антитело за счет непосредственного и опосредованного влияния на комплексы антиген-антитело, что выражается в увеличении времени начала агглютинации и уменьшении степени агглютинации.

4.3 Визуализация влияния лактата на образование комплексов антиген-антитело (гликопротеины А и В)

С целью дальнейшего изучения и визуализации вызываемых исследуемым интермедиатом изменений нами было решено применить методы конфокальной микроскопии.

Микрофотографии взаимодействия лактата с комплексом антиген-антитело были получены с использованием двух режимов конфокальной микроскопии: основного рассеивания и в режиме флуоресценции. Результаты оценивали с использованием таких параметров как площадь образованных агглютинатов и объем площади кадра, занимаемый агглютинатами.

При анализе микрофотографий, полученных в режиме основного рассеивания, было выявлено изменение формы и площади образуемых комплексов агглютинатов в исследуемых образцах под влиянием лактата (рисунок 4.5Б, 4.5Г) по сравнению с контрольными образцами (рисунок 4.5А, 4.5В). При этом отметим, что гликопротеин А (рисунок 4.5Б) вступает во взаимодействие с лактатом более активно, по сравнению с гликопротеином В (рисунок 4.5Г). Размер комплексов, образуемых под влиянием лактата с гликопротеином А, увеличился с 67,4 мкм² в группе контроля до 152 мкм² в опытной группе, что составило 4,7% и 19,4 % объема площади кадра соответственно. При добавлении лактата к гликопротеину В фиксировались следующие изменения: уменьшение площади агглютинатов с 44,8 мкм² в группе контроля до 42,2 мкм² в опытной группе, объема площади кадра, занимаемого агглютинатами, уменьшился с 14,1% до 2,9% соответственно.

Кроме того, наблюдается отличие в форме и величине комплексов, образуемых под действием лактата с гликопротеинами А и В. Комплексы, образованные с гликопротеином А характеризуются более крупным размером, большим числом субъединиц, входящих в агглютинат, сложной полиморфной структурой; для комплексов, образованных с гликопротеином В, характерна более простая форма, малое число субъединиц, входящих в состав агглютината.

Использование режима флюоресценции при проведении конфокальной микроскопии помогает уменьшить число неспецифических взаимодействий и более точно охарактеризовать полученные изменения. При использовании данного режима микрофотографии визуализируются комплексы, накопившие флюорохром ФИТЦ и испускающие свечение.

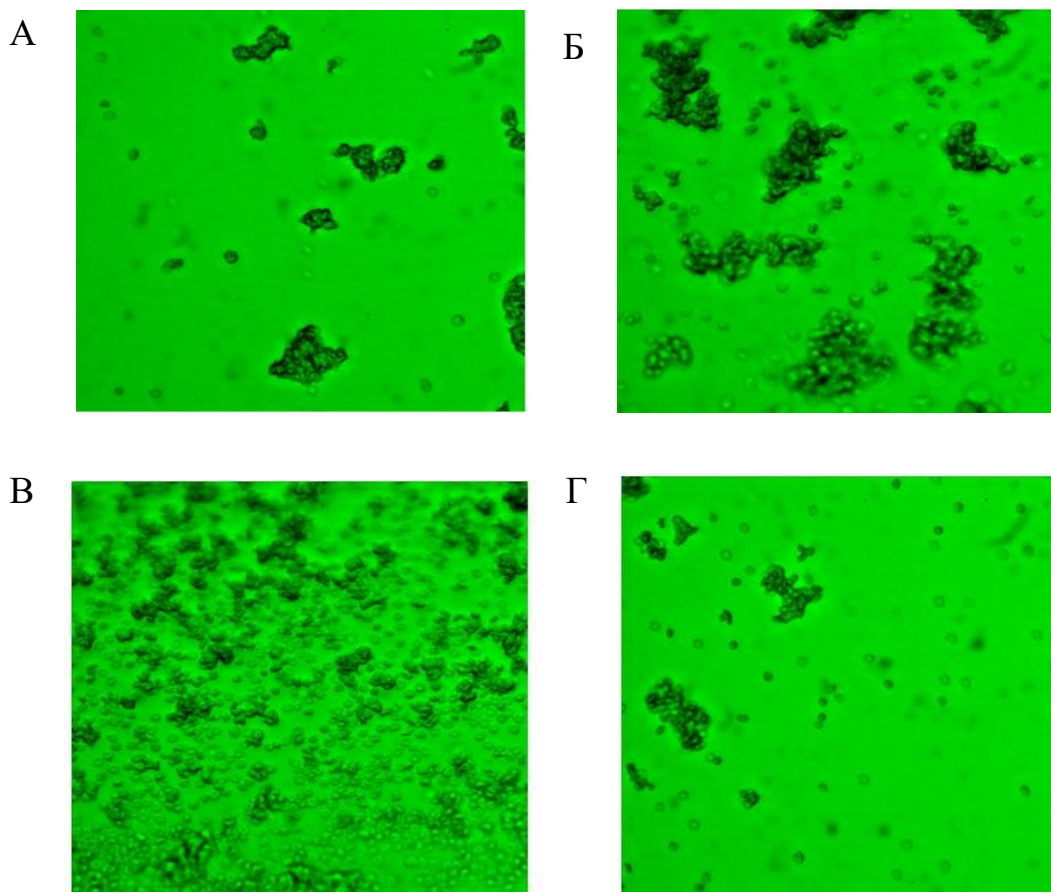


Рисунок 4.5 – Электронная микрофотография взаимодействия гликопротеинов А и В с моноклональными антителами в режиме основного рассеивания (увеличение 400). А – гликопротеин А (контрольный образец); Б – гликопротеин А после инкубации с лактатом; В – гликопротеин В (контрольный образец); Г – гликопротеин В после инкубации с лактатом

Полученные данные свидетельствуют о том, что введение лактата в экспериментальную систему приводит к увеличению образования комплексов антиген-антитело. Объем кадра, содержащий комплексы гликопротеинов при введении в систему лактата, составил 6,7% для антигенов А (рисунок 4.6 Б) и 0,3% для антигенов В соответственно (рисунок 4.6 Г), площади образованных комплексов составили 50,4 мкм² при взаимодействии с гликопротеином А и 17,7 мкм² при взаимодействии с гликопротеином В.

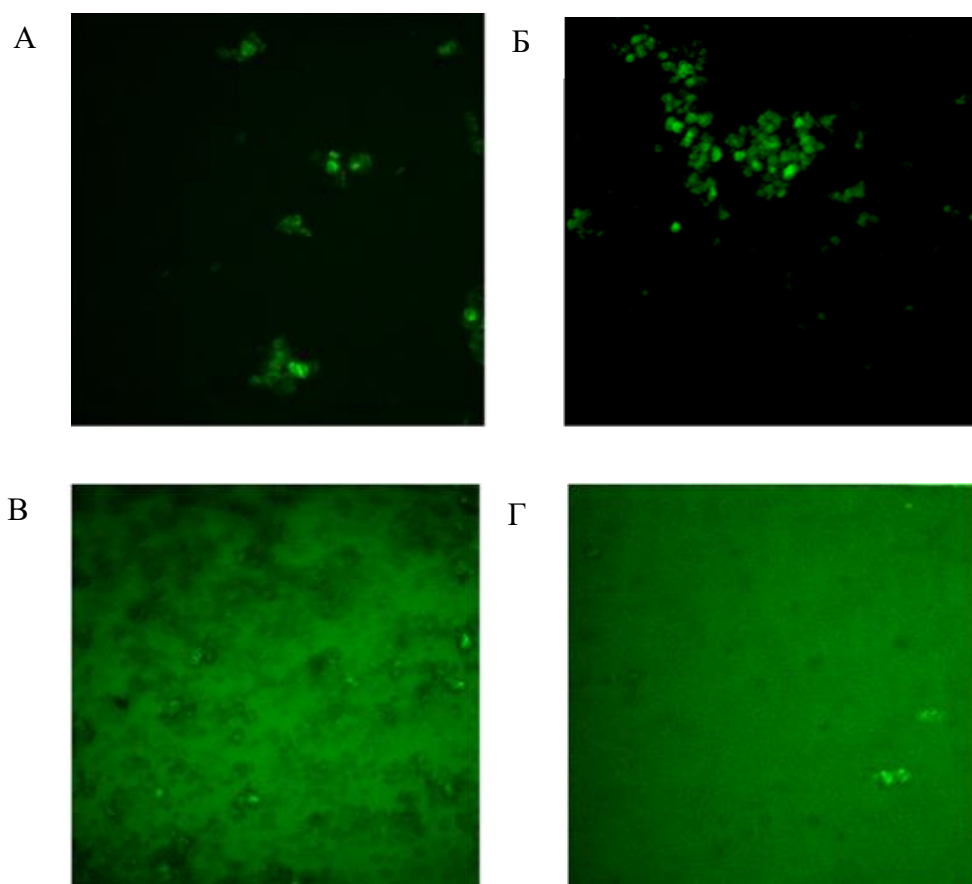


Рисунок 4.6 – Режим флюоресценции: микрофотографии антиген-антительных комплексов с гликопротеинами А и В (увеличение 400).

А – гликопротеины А (контрольный образец); Б – гликопротеины А после инкубации с лактатом; В – гликопротеины В (контрольный образец); Г – гликопротеины В после инкубации с лактатом

При оценке пространственного распределения пиков интенсивности свечения флюорохрома было отмечено, что лактат оказывает разнонаправленное влияние на гликопротеины А и В. Увеличилось число пиков флюоресценции, образованных под воздействием лактата на гликопротеин А (рисунок 4.7 Б), что свидетельствует об активирующем влиянии данного метаболита. В то же время отмечается снижение количества пиков флюоресценции при добавлении лактата к гликопротеину В (рисунок 4.7 Г), что позволяет говорить об ингибирующем влиянии исследуемого интермедиата на данную антигенную детерминанту.

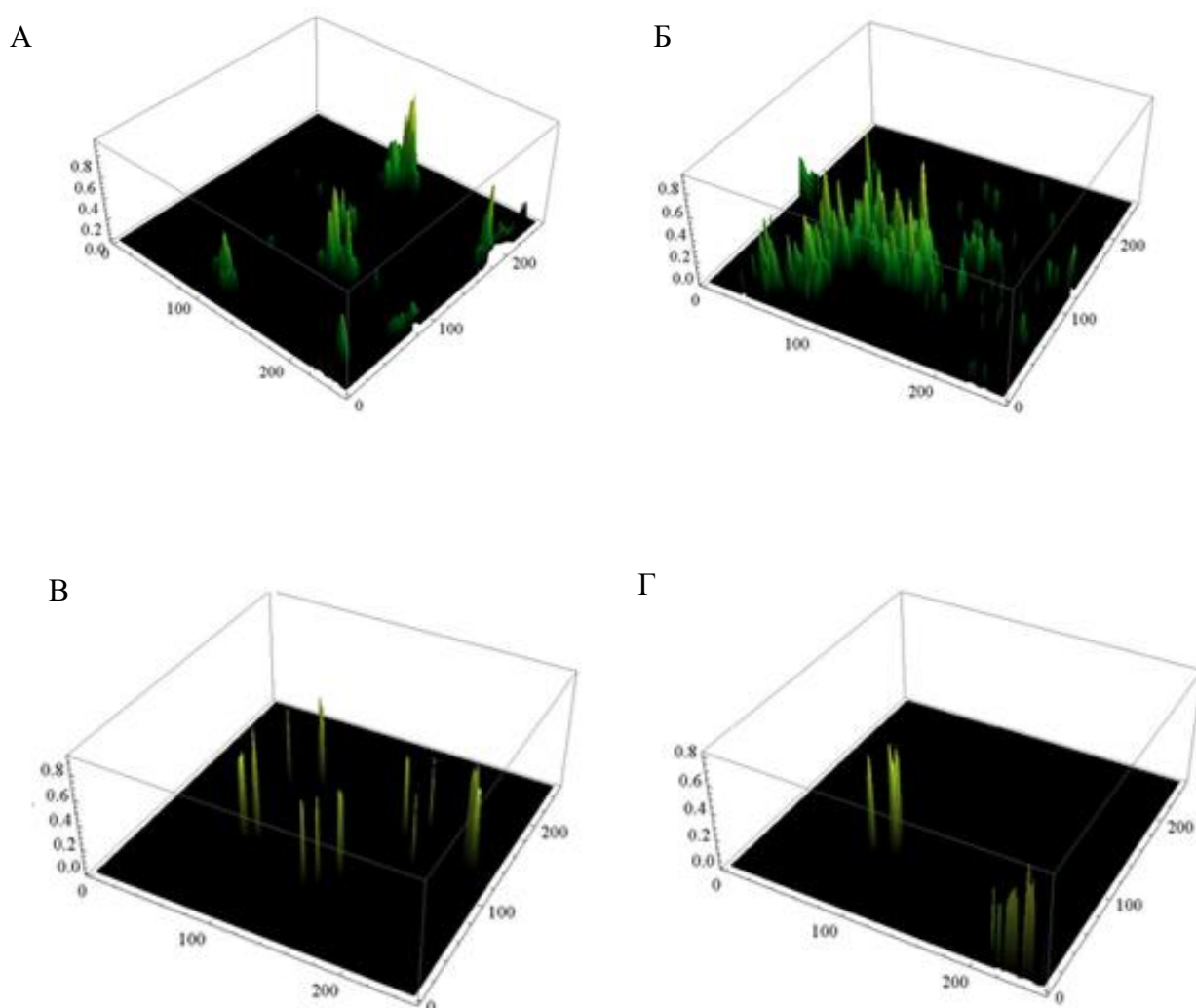


Рисунок 4.7 – Диаграммы распределения интенсивности флуоресценции антиген-антительных комплексов в пространстве. А – гликопротеины А (контрольный образец); Б – гликопротеины А после инкубации с лактатом; В – гликопротеины В (контрольный образец); Г – гликопротеины В после инкубации с лактатом

Природа влияния лактата на процессы антиген-антительного взаимодействия оставляет много вопросов, однако, с уверенностью можно говорить о том, что различные малые молекулы оказывают не равнозначное влияние на антигенные детерминанты.

Например, внесение пирувата в схожую экспериментальную систему вызывает совершенно иные изменения. Гликопротеин А показывает высокую устойчивость к данному соединению и мало вступает в реакции, в то время как гликопротеин В проявляет большую активность по отношению к пирувату [Н.А.Колотьева и соавт., 2016].

Допустимо предположить, что малые молекулы, в частности лактат, конкурируют за активные функциональные группы антигенных детерминант, что приводит к конформационным изменениям всей молекулы, что в конечном счете сказывается на процессе межмолекулярного узнавания, меняя способность антигенов связываться с антителами [N.C.Hughes-Jones et al., 1964]. Кроме того, вероятно, что активные группы молекулы лактата взаимодействуют с активными группами соединений, составляющих непосредственное окружение центра связывания антигенной детерминанты, также оказывая влияние на протекание процессов взаимодействия антиген-антитело.

Нами была выявлена биологическая вариабельность в содержании компонентов лактатдегидрогеназной системы: лактата, пирувата, активности лактатдегидрогеназы в зависимости от групповой принадлежности крови по системе АВ0. Наибольшая активность лактатдегидрогеназы и наименьшее соотношение показателей лактата и пирувата были выявлены в группе людей с А (II) группой крови, самая низкая активность фермента с наиболее высоким коэффициентом содержания метаболитов была отмечена у людей с 0 (I) группой крови.

Нами было установлено, что гликопротеины А и В, расположенные на мембране эритроцитов чувствительны к введению лактата, при этом восприимчивость антигенов неодинакова: степень ответа гликопротеина А на

введение лактата превосходит таковую для гликопротеина В. Естественные и моноклональные антитела также чувствительны к добавлению лактата в экспериментальную систему. Проведенная нами визуализация комплексов антиген-антитело позволяет нам с большей достоверностью говорить о роли лактата в выявленных изменениях.

Несмотря на то, что взаимодействие антиген-антитело является достаточно изолированным и дает возможность количественной оценки изменений, нельзя однозначно исключить вклад ряда факторов в наблюдаемое явление, например образование сложных ассоциаций гликопротеинов А и В с лактатом и с другими гликопротеинами мембраны эритроцитов и др. Отмеченное выше обуславливает необходимость изучения реакции индивидуальных белков на введение низкомолекулярного лиганда. Оптимальной будет являться ситуация выбора белка, обладающего биологической функцией, которая поддается внешней количественной оценке: такими свойствами обладают монокаталитические белки. В качестве объекта нашего дальнейшего изучения была выбрана лактатдегидрогеназная каталитическая система.

ГЛАВА 5.

ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА КАК МИШЕНЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ ЛИГАНДАМИ

Практически все жизненно важные аспекты клеточного поведения, такие как адгезия, миграция, пролиферация и гибель клеток, опосредованы взаимодействием белков друг с другом [M.Elowitz, W.Lim, 2010]. Способность избирательно нарушать или усиливать отдельные белок-белковые взаимодействия является мощным рычагом воздействия на клетку, позволяя сообщать ей сигналы на молекулярном языке [V. Gurevich, E. Gurevich, 2012].

Методы анализа белков и их взаимодействия с другими биомолекулами имеют большое значение для оценки клеточных функций. На сегодняшний день существует достаточное количество подходов, позволяющих изучать взаимодействие белков с другими молекулами *in vitro*. Однако, открытым вопросом в области биоаналитических технологий остается возможность максимально приблизить процесс, происходящий *in vitro*, к процессу *in vivo* [C.J.Wienken et al., 2010]. Особое значение это имеет при необходимости оценивать параметры связывания белка с низкомолекулярными лигандами, поскольку данный процесс подвержен многофакторному влиянию и требует высокой точности. Одним из эффективных методов измерения аффинитета связи белок-лиганд является микрокапиллярный термофорез, который описывает направленное движение молекул, индуцированное изменением температурного градиента, зависящее от размера молекул, заряда и гидратной оболочки [S.C.Tso et al., 2018].

Лактатдегидрогеназная система, выбранная нами в качестве изучаемой, включает в себя два субстрата – лактат и пируват. По этой причине использовать данные метаболиты в проведении эксперимента не представлялось целесообразным: внесение их в систему будет влиять на равновесие протекаемой реакции. Вследствие этого, нами был выбран аналог

одного из субстратов – оксалоацетат, который структурно имеет сходство с пируватом и отличается от него наличием дополнительной карбоксильной группы.

Оксалоацетат, выбранный нами в качестве лиганда для взаимодействия с каталитическим белком, представляет собой важнейший интермедиат в нескольких метаболических путях, таких как цикл Кребса и глюконеогенез. В цитозоле оксалоацетат восстанавливается до малата, тем самым меняя соотношение НАДН/НАД⁺, что стимулирует протекание гликолиза, а образованный малат может в последующем возвращаться в митохондрии и выполнять роль углеродного скелета для дальнейших превращений. Кроме того, оксалоацетат может декарбоксилироваться и фосфорилироваться в цитозоле ферментом фосфоенолпируват карбоксикиназой [P.Nakimi et al., 2007]. Вместе с тем, в последнее время появились исследования, посвященные изучению параметаболического потенциала этой молекулы в контексте митохондриальной и биоэнергетической медицины [H.M.Wilkins et al., 2014]. Сегодня оксалоацетат считается перспективной молекулой-кандидатом для разработки терапевтических средств в борьбе с нейродегенеративными заболеваниями, последствиями ишемической травмы головного мозга [A.Zlotnik et al., 2012].

5.1 Установление факта взаимодействия оксалоацетата и лактатдегидрогеназы методом микрокапиллярного термофореза

Мы использовали метод микрокапиллярного термофореза (MST) в качестве инструмента для характеристики взаимодействия оксалоацетата и лактатдегидрогеназы. В отличие от существующих методов, MST может быть выполнен в растворе с использованием микроколичества анализируемых образцов, без иммобилизации соединений на каких-либо носителях. Это оптический бесконтактный метод, что позволяет свести к минимуму потенциальное загрязнение образца, влияющее на точность

измерения. В соответствии с представленными в литературе данными, анализ такого рода взаимодействий представляется сложной задачей, поскольку низкомолекулярные соединения часто не оказывают существенного влияния на заряд или размер молекулы белка, а лишь вызывают слабые конформационные изменения [S.A.Seidel et al., 2012]. Чувствительность прибора, на котором проводились измерения (Monolith NT.115), оказалась достаточной для определения факта взаимодействия оксалоацетата и лактатдегидрогеназы с определением константы диссоциации.

Нами была приготовлена серия из 16 разведений, в которых конечная концентрация меченой красителем лактатдегидрогеназы оставалась неизменной и составила 1,65 мкМ, а конечная концентрация оксалоацетата изменялась в диапазоне от 40 до 0,0012 мкМ. Сначала была произведена оценка сигнала, получаемого от анализируемых образцов в 16 капиллярах (рисунок 5.1). Качество сигнала во всех анализируемых разведениях было признано удовлетворительным.

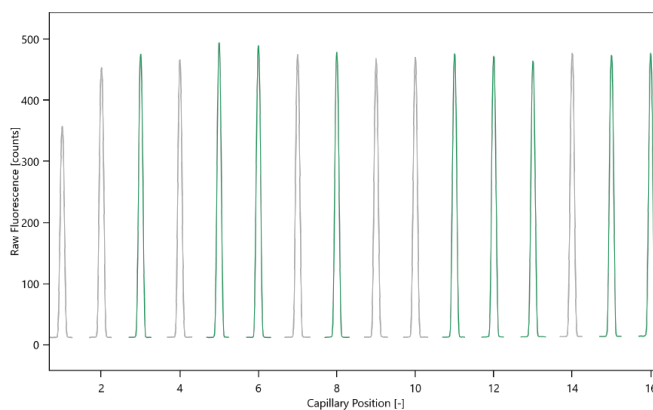


Рисунок 5.1 – Предварительное сканирование капилляров на приборе Monolith NT.115. Оценка качества исходящего сигнала. Ось OY: Флуоресценция. Ось OX: Позиция капилляров

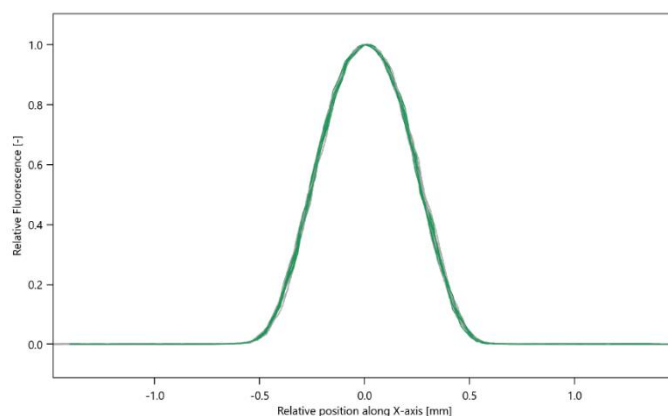


Рисунок 5.2 – Форма сигнала от анализируемых образцов. Ось ОУ: Относительная флуоресценция. Ось ОХ: Позиция капилляров относительно оси ОХ (мм)

Затем мы оценивали получаемый сигнал от каждого конкретного образца (рисунок 5.2). Форма полученной кривой подтверждает корректность проведенной пробоподготовки и определяет возможность перехода к следующему этапу.

До включения инфракрасного (ИК) лазера молекулы равномерно распределены и обнаруживается постоянная «начальная флуоресценция». В течение первой секунды после активации ИК лазера наблюдается «Т-образный скачок», что соответствует быстрому изменению флуорофорных свойств вследствие быстрого изменения температуры. Как правило, изменение флуоресценции измеряется в течение 30 с. После выключения ИК лазера происходит обратный «Т-образный скачок», за которым следует «обратная» диффузия молекул. На рисунке 5.3 показано термофоретическое движение меченой молекулы лактатдегидрогеназы, отображен переход из «свободного» состояния (синяя стрелка) после включения ИК-лазера (синяя вертикальная полоса) в связанное с нефлуоресцентным лигандом - оксалоацетатом (зеленая стрелка), что сопровождается различным уровнем получаемого сигнала. Обратная диффузия молекул после выключения ИК-лазера показана красной стрелкой. Изменение термофоретической подвижности выражается изменением нормализованной флуоресценции

(ΔF_{norm}), которая определяется как F_{hot}/F_{cold} (F-значения соответствуют средним значениям флуоресценции между определенными областями, отмеченными красным и синим полосами, соответственно). Изменение концентрации нефлуоресцентного лиганда приводит к постепенному изменению сигнала флуоресценции, который изображается как ΔF_{norm} для получения кривой титрования.

По окончании записи кривых MST для каждого капилляра программа автоматически строит график изменения флуоресценции в зависимости от времени (рисунок 5.4). Затем с помощью предустановленного программного обеспечения производится расчет степени связывания лактатдегидрогеназы с оксалоацетатом путем построения графика отношения между флуоресценцией перед и после включения лазера в зависимости от концентрации оксалоацетата.

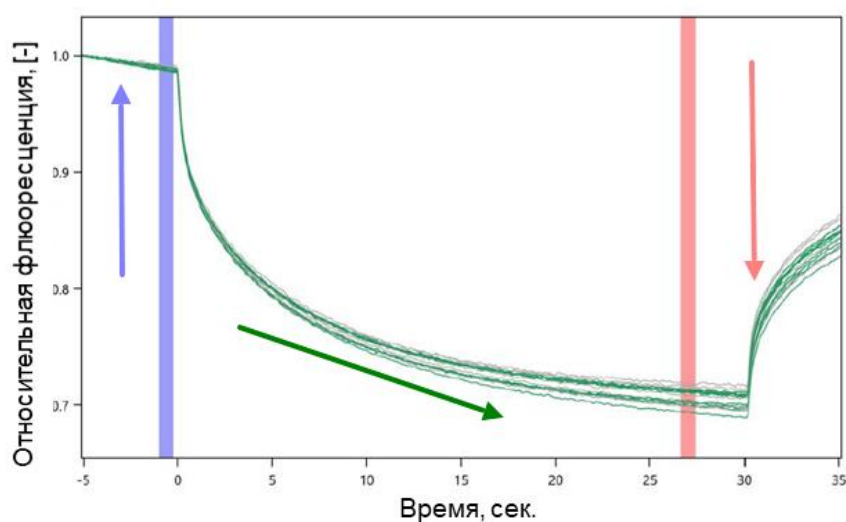


Рисунок 5.3 – Анализ взаимодействия ЛДГ (при постоянной концентрации (1.65 мкМ) и оксалоацетата в изменяющейся концентрации. Смешивание образцов и анализ проводился при температуре 25°C. Показаны термофоретические кривые несвязанного и связанного с оксалоацетатом состояния меченной ЛДГ

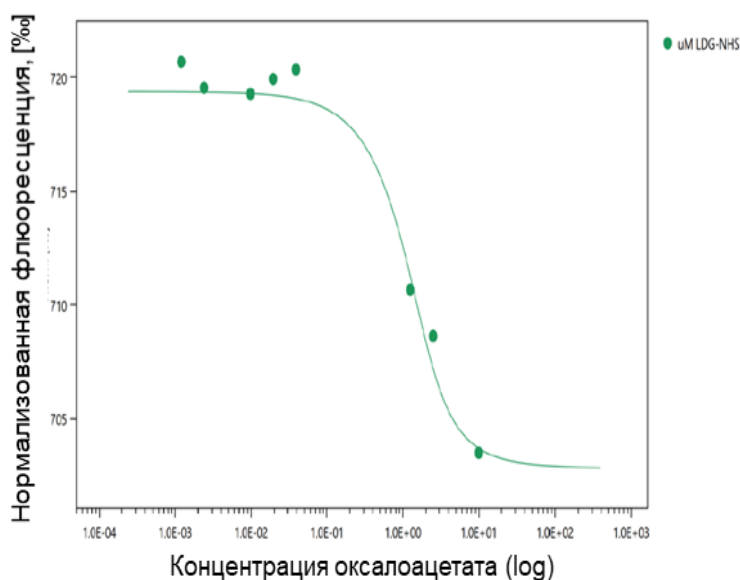


Рисунок 5.4 – Анализ взаимодействия ЛДГ при постоянной концентрации (1.65 мкМ) и оксалоацетата в изменяющейся концентрации с применением программного обеспечения Nano Temper Analysis Software Package. Расчетное значение K_d составляет 0.5 мкМ

Обработка данных с применением программного обеспечения позволила получить сглаженную s-образную кривую и произвести расчет константы диссоциации. Константа равновесной диссоциации (K_d) может быть использована для описания средства связывания между лигандом и его мишенью, определения силы биомолекулярного взаимодействия. Аффинитет связи между белком и лигандом находится в зависимости от сил нековалентного взаимодействия, в частности, гидрофобных и электростатических сил, водородных связей и сил Ван-дер-Ваальса. Чем ниже значение константы равновесной диссоциации, тем выше средство исследуемого лиганда к его мишени.

Отметим, что в большинстве случаев константа диссоциации численно соответствует константе Михаэлиса-Ментен, более того, использование константы Михаэлиса-Ментен для описания средства связи фермента к субстрату справедливо лишь при принятии гипотезы стационарного состояния, что редко соответствует реальным условиям проводимого

эксперимента [В.Ф.Лассетер, 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.

В открытой базе данных белков PDB содержится картина смоделированного 3D взаимодействия лактатдегидрогеназы с оксалоацетатом (рисунок 5.6). Согласно современным представлениям, связывание оксалоацетата происходит в участке, расположенном очень близко к активному центру фермента, но все же находящемся за его пределами [М.Т.Алам et al., 2017].

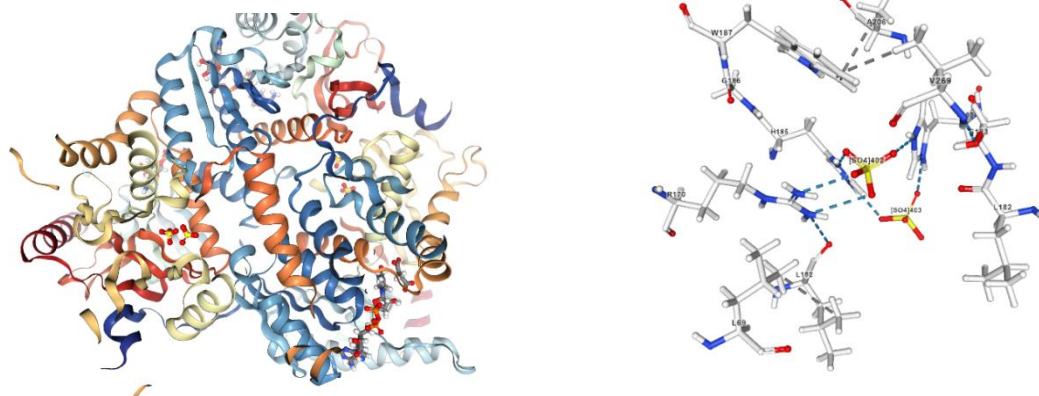


Рисунок 5.6 – Взаимодействие оксалоацетата с лактатдегидрогеназой.

Оксалоацетат на рисунке изображен желтым цветом.

<https://www.rcsb.org/3d-view/5NQQ/1>

5.2 Оценка влияния оксалоацетата на термостабильность лактатдегидрогеназы методом дифференциальной сканирующей флуориметрии

Дифференциальная сканирующая флуориметрия (DSF) является одним из методов оценки термостабильности белков в различных условиях, в том числе после связывания с малыми молекулами-лигандами [A.Simeonov, 2013]. При описании изменений, происходящих с белком во время осуществления эксперимента будем использовать термин «плавление» (англ.-melting), который 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]. Для определения точки плавления белка (T_m) (точки температурного перехода), когда половина белка находится в свернутой конформации, а вторая половина подверглась тепловой денатурации, можно использовать либо изменение флуоресценции в одном из двух каналов, либо, наоборот, соотношение интенсивности флуоресценции (F350/F330) в зависимости от температуры или времени.

Считается, что лиганды, имеющие более высокое сродство, сдвигают T_m в большей степени. Правильность определения температурного перегиба зависит от насыщения молекулы белка исследуемым лигандом. Определение "истинной" T_m лиганд-связанного белка может быть осуществлено только с помощью эксперимента по определению типа концентрационно-ответной реакции для того, чтобы убедиться, что участок связывания действительно был насыщен [G.Sinisterra et al., 2012].

Мы готовили серию из 6 разведений, в которых конечная концентрация изменялась от 16 до 0,6 мкМ, а конечная концентрация фермента оставалась стабильной и составила 1 мкМ (Таблица 5.1).

Таблица 5.1 – Температура плавления ЛДГ при добавлении оксалоацетата в различных концентрациях

	Контроль ЛДГ	Оксалоацетат, мкМ					
		16	8	4	2	1	0,5
T, °C	56,3	56	56,4	56,5	56,6	56,6	56,6

На рисунке 5.7 представлены кривые плавления ЛДГ в комплексе с оксалоацетатом. Верхний график представляет собой зависимость отношений флуоресценции полученных при 330 и 350 нм от температуры. Нижний график представляет собой кривую первой производной значений отношений флуоресценции в зависимости от температуры.

Обращает на себя внимание, что при небольшой разнице в температуре плавления ЛДГ отмечается различное состояние комплексов ЛДГ-оксалоацетат, что проявляется различной глубиной пика. 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.

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. При сравнении кривых, полученных с помощью программного обеспечения Prometheus NT.48 и сырых (raw) данных с прибора (рисунок 5.8) следует отметить более сглаженный характер графика после их обработки дополнительной программой.

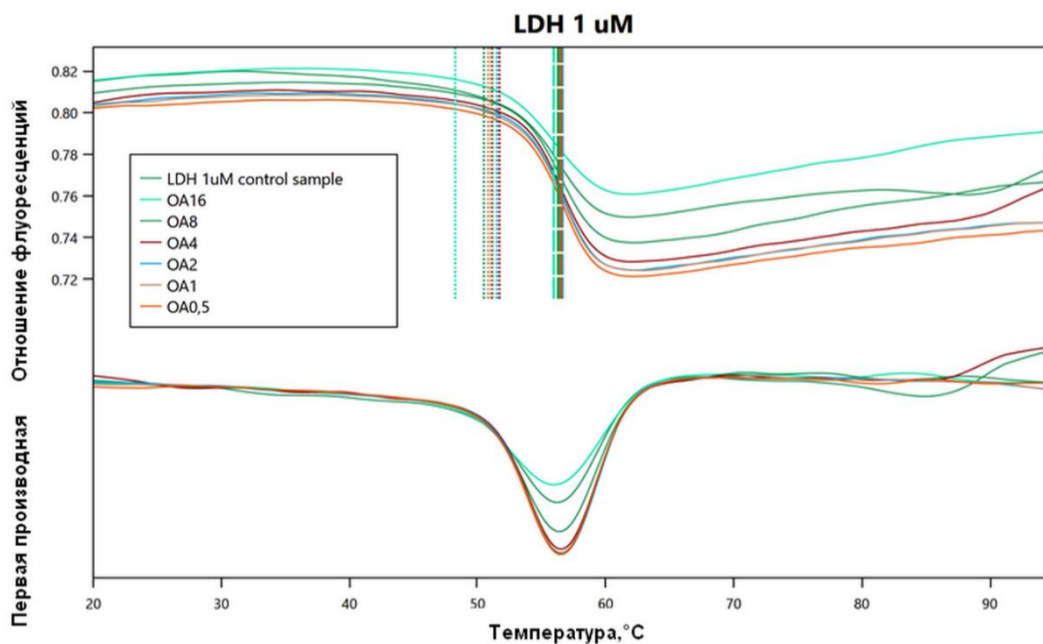


Рисунок 5.7 – Кривые плавления ЛДГ в комплексе с оксалоацетатом в различной концентрации

При оценке несглаженных данных отмечается наличие разбросов пиков флуоресценции непосредственно перед началом плавления ЛДГ и при достижении белком точки температурного перегиба.

Температурный диапазон, 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 (таблица 5.2). Регрессионные коэффициенты для различной концентрации оксалоацетата приведены в таблице 5.3.

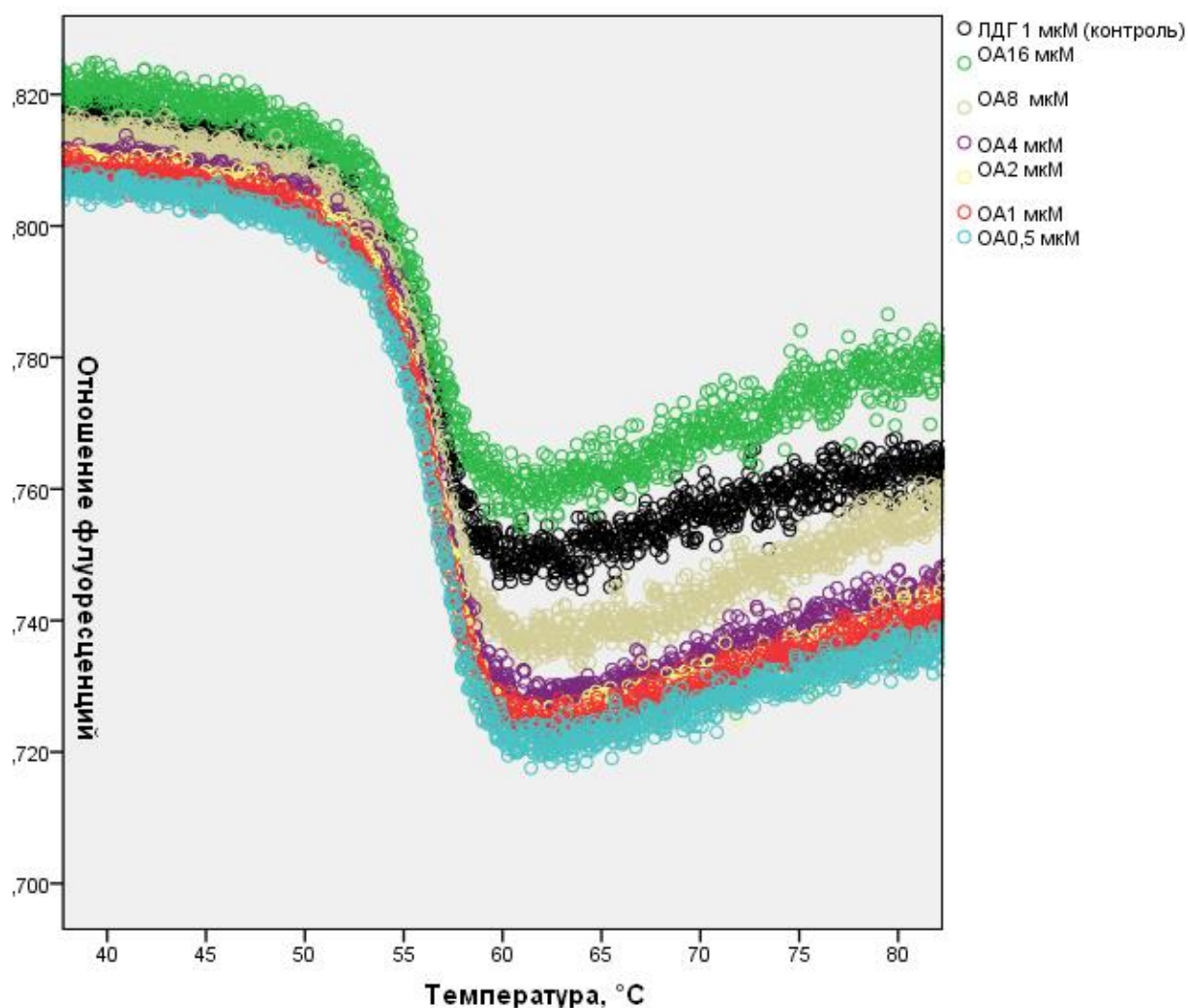


Рисунок 5.8 – «Несглаженные» кривые плавления ЛДГ без оксалоацетата (черная кривая) и при добавлении различных концентраций оксалоацетата (цветные кривые)

Таблица 5.2 – Коэффициенты детерминации и стандартная ошибка регрессии модели аппроксимации кривых плавления ЛДГ в присутствии оксалоацетата в меняющихся концентрациях

Концентрация, мкМ	Оксалоацетат	
	Коэффициент детерминации, R^2	Стандартная ошибка регрессии
16	0,988	0,0025
8	0,995	0,0021
4	0,996	0,0021

2	0,997	0,0018
1	0,996	0,0020
0,5	0,996	0,0019
0	0,992	0,0022

*Примечание: все построенные модели статистически значимы при $p < 0,001$.

Таблица 5.3 – Переменные регрессионной модели, моделирующей процесс плавления ЛДГ под влиянием оксалацетата 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)

С целью сравнения имеющихся параметров нами были построены графики, отражающие значение параметра в зависимости от определенной концентрации оксалоацетата.

Параметр b соответствует точке температурного перегиба и приводится на рисунке 5.9. Представлены данные, соответствующие математической модели, а также данные, полученные с помощью Prometheus NT.48 Software. Характер и величина сдвига точки температурного перегиба, оцененные различными методами, совпадают.

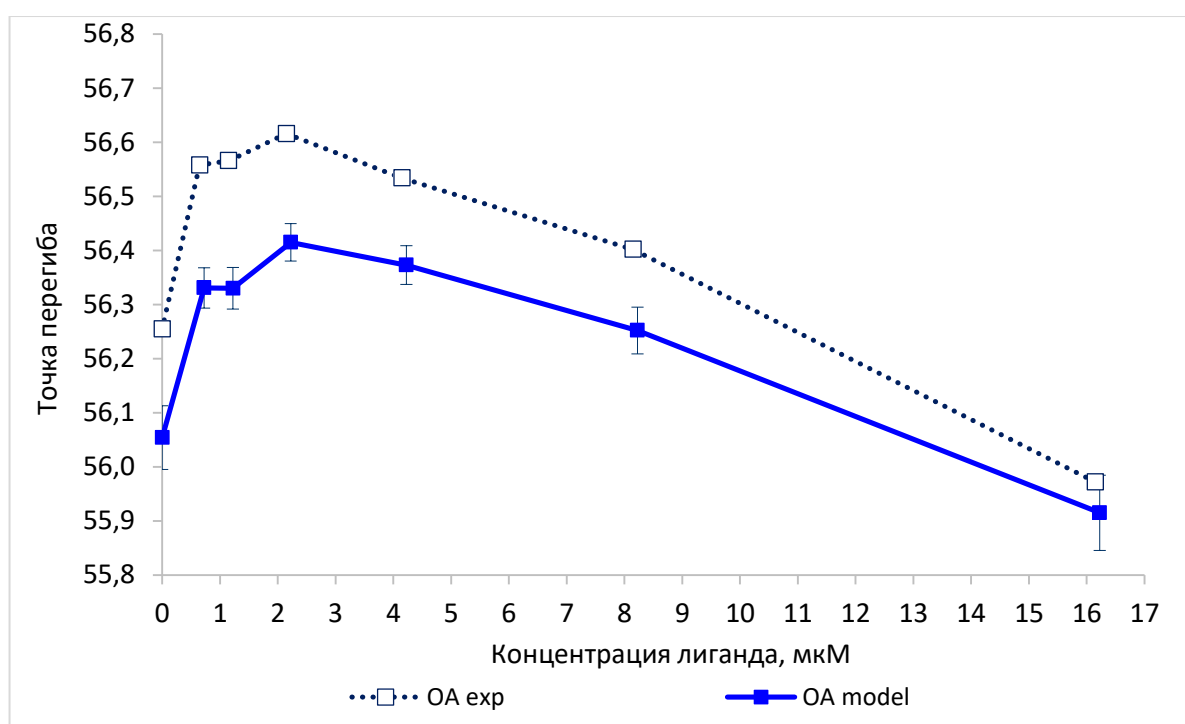


Рисунок 5.9 – Точки температурного перегиба экспериментальных и смоделированных кривых плавления ЛДГ при различных концентрациях оксалоацетата

Концентрация оксалоацетата от 0,5 до 8 мкМ приводит к повышению температуры плавления ЛДГ, а концентрация 16 мкМ вызывает снижение термостабильности белка. Максимальное изменение температуры плавления при добавлении оксалоацетата возникает при концентрации 2 мкМ. Оценки сдвига, полученные нами при моделировании нелинейной регрессией и программным обеспечением Prometheus NT.48, различаются незначительно:

расхождение с данными, полученными программным обеспечением прибора, составило 0,2 °С.

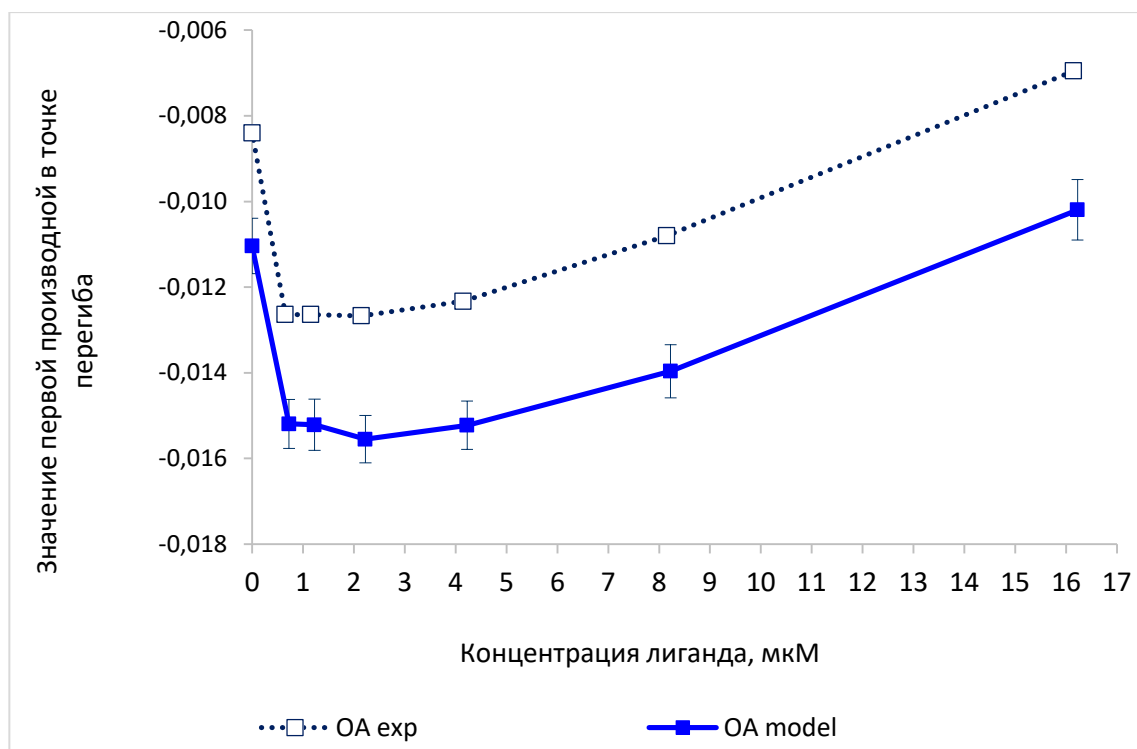


Рисунок 5.10 – Максимальная скорость плавления экспериментальных и смоделированных кривых ЛДГ при добавлении оксалоацетата

Для анализа максимальной скорости плавления ЛДГ в присутствии оксалоацетата (рисунок 5.10) из результатов по данным приборного обеспечения были извлечены значения первых производных в точках перегиба. Первые производные при температуре реакционной смеси $t=b$ были вычислены с использованием уравнения $f'(t)=-0,25a(d-c)$. Погрешности полученных результатов оценены по правилам расчета погрешностей арифметических операций. Отрицательные значения производных отражают уменьшение соотношения флуоресценции при разворачивании белка. Чем больше абсолютное значение первой производной, тем выше скорость плавления белка.

Оксалоацетат вызывал существенное увеличение скорости плавления ЛДГ в концентрациях 0,5–4 мкМ ($p<0,05$ по сравнению с отсутствием лигандов) с последующим его снижением в концентрациях 8-16 мкМ.

При сравнении максимальных скоростей плавления, полученных разными способами (по данным приборного программного обеспечения и математического моделирования) выявлено систематическое расхождение в среднем на 0,003. Вероятно, это связано с тем, что выбранная форма аналитической зависимости хорошо соответствует экспериментальным данным только на участке с максимальной скоростью плавления, но не перед ним и не после него. Именно из-за этого при построении регрессионной модели был выбран достаточно узкий диапазон температур, при котором происходит плавление. Недостаточно точные оценки параметра d разработанных регрессий приводят к незначительному смещению в оценке максимальной скорости плавления. Однако с точки зрения цели настоящего исследования по изучению факторов, влияющих на характеристики кривой плавления, данные поправки не оказывают статистически значимого влияния.

Также нами было проведено более детальное моделирование поведения кривой плавления лактатдегидрогеназы под влиянием различных концентраций оксалоацетата на участке физиологического диапазона температур 36,5-37,5°C. Проанализировано 29 измерений отношений флуоресценций в различных температурных точках заявленного коридора температур. Установлено, что влияние концентрации оксалоацетата на конформацию ЛДГ статистически значимо (таблица 5.4), что проявляется уменьшением или увеличением интенсивности флуоресценции. Отсутствие статистически значимой зависимости было выявлено для концентраций оксалоацетата 2 и 4 мкМ. Оксалоацетат в диапазоне концентраций от 0,5-2 мкМ вызывают 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 ($p < 0,001$).

Таблица 5.4 – Сравнение влияния оксалоацетата на термостабильность ЛДГ при 36,5-37,5°C

Концентрация лиганда	ОА M±SD
Контроль (ЛДГ)	0,818±0,0011
0,5 мкМ	0,806±0,0009
1 мкМ	0,809±0,0013
2 мкМ	0,810±0,0011
4 мкМ	0,811±0,0012
8 мкМ	0,814±0,0012
16 мкМ	0,821±0,0018
Сравнение различных концентраций лигандов, p ANOVA	<0,001
p K-0,5	<0,001
p K-1	<0,001
p K-2	<0,001
p K-4	<0,001
p K-8	<0,001
p K-16	<0,001

Обращает на себя внимание способность низких концентраций оксалоацетата оказывать термостабилизирующее воздействие, которое проявляется не только в целом смещением температуры плавления в сторону увеличения ее значения, но и проявлением протективного действия на участке кривой, соответствующей нормальной температуре человеческого тела.

Имеются сведения о том, что малые молекулы, являясь структурными аналогами субстратов каталитических белков, могут повышать их термостабильность. В одном из исследований было показано протективное действие субстратов – лактата, пирувата, и их структурных аналогов – оксамата и оксалата на стабильность лактатдегидрогеназы при нагревании в диапазоне 52-64°C (J.Sudi, 1970). Более того, максимальный стабилизирующий эффект достигался при добавлении не только субстратов или аналогов, но и кофакторов – НАД/НАДН. Принимая во внимание

общность химической организации оксалоацетата с представленными молекулами и результаты микрокапиллярного термофореза, подтверждающие факт связывания оксалоацетата с ЛДГ, представляется допустимым объяснить полученный термостабилизирующий эффект изменением конформации каталитического белка, возникшим в результате связывания с лигандом.

5.3 Определение влияния оксалоацетата на функционирование лактатдегидрогеназной каталитической системы

На следующем этапе нами была проведена серия экспериментов по выявлению влияния различных концентраций оксалоацетата на функционирование лактатдегидрогеназной каталитической системы. Активность лактатдегидрогеназы оценивалась как в прямой, так и в обратной реакции. Результаты проведенного эксперимента представлены в таблице 5.5

Таблица 5.5 – Влияние оксалоацетата на активность лактатдегидрогеназы (Е/мг белка)

		Прямая реакция Пируват-Лактат M±m (n=10 для каждой концентрации)	Обратная реакция Лактат-Пируват M±m (n=10 для каждой концентрации)
		Е/мг белка	Е/мг белка
Контроль		14,5 ± 0,19	2,95 ± 0,1
1 мкМ	p	15,5 ± 0,13	2,64 ± 0,08
		0,006	0,03
10 мкМ	p	15,2 ± 0,38	2,63 ± 0,04
		0,102	0,65
0,1 мМ	p	13,56 ± 0,21	2,63 ± 0,06
		0,01	0,03
1 мМ	p	8,08±0,07	0,83±0,011
		0,001	0,0001
1,5 мМ		6,4±0,05	0,67±0,008

	p	0,0001	0,0001
2 мМ		4,99±0,43	0,31±0,01
	p	0,0001	0,0001
5 мМ		полное ингибирование	

Примечание: *p<0,05

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.

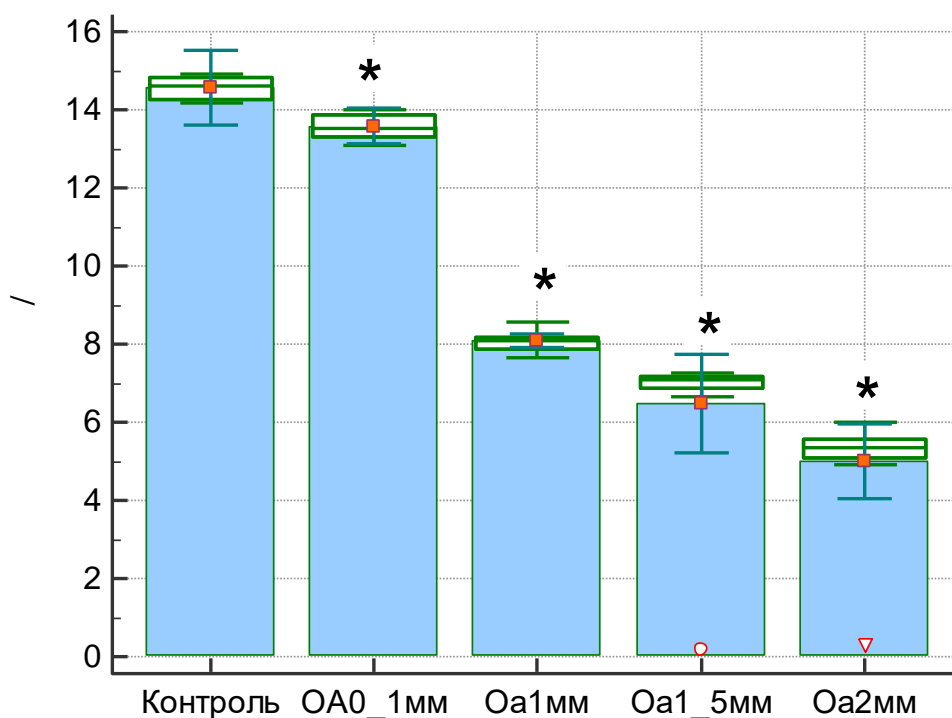


Рисунок 5.11 – Влияние оксалоацетата в конечной концентрации 0,1 мМ-2 мМ на протекание прямой лактатдегидрогеназной реакции (пируват-лактат)

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 5.12). 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 ($p=0,03$).

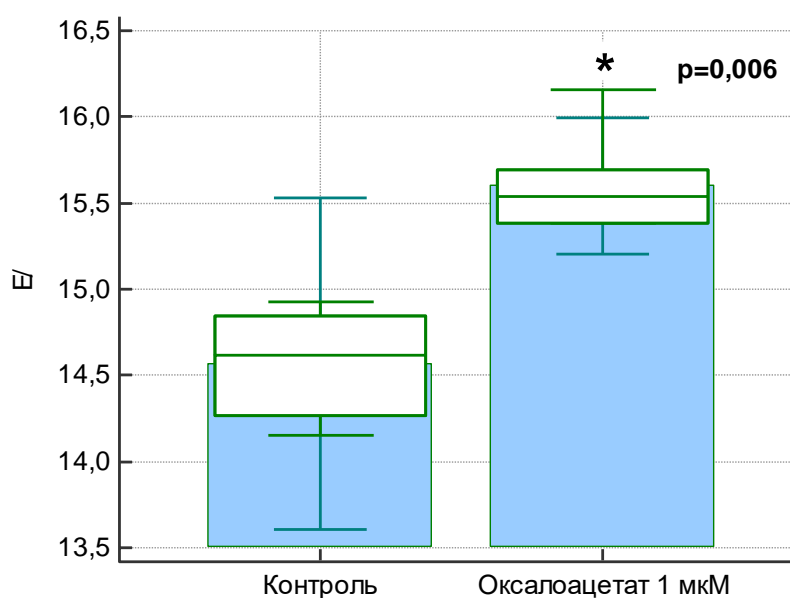


Рисунок 5.12 – Влияние оксалоацетата в конечной концентрации 1 мкМ на протекание прямой лактатдегидрогеназной реакции (пируват-лактат)

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.

Для объяснения наблюдаемых изменений необходимо обратиться к строению активного центра ЛДГ. Он содержит каталитически важные His193 и Arg106 (нумерация соответствует сердечной изоформе фермента человека), а также Arg169, который связывается с карбоксильной группой субстрата через боковую цепь [J.R.Pineda et al., 2007]. Важным шагом в проявлении

каталитической активности ЛДГ является окончательное замыкание поверхностной группы аминокислотных остатков (98-110), часто называемой подвижной петлей над карманом связывания субстрата [A.Clarke et al., 1986; S.McClendon et al., 2005].

Интересно отметить, что изменение аминокислотной последовательности указанных остатков (98-110) приводит к расширению или сужению субстратной специфичности фермента. Например, было установлено, что ЛДГ *Lactobacillus pentosus* и *L. Casei* проявляет широкую субстратную специфичность и может использовать в качестве субстратов несколько кетокислот, в числе которых оксалоацетат, гидроксипируват, фенилпируват и др. [K.Arai et al., 2001]. Было установлено, что подобный эффект связан с заменой аминокислоты пролина на аспарагин. При проведении опытов с данной культурой по изменению аминокислотной последовательности отмечено, что обратная замена аминокислоты аспарагина на пролин приводит к сокращению субстратной специфичности и понижению сродства ЛДГ даже к пирувату.

Ингибирование активности фермента представляет собой важный механизм регуляции клеточных функций. В соответствии с базой данных BRENDA насчитывается 30107 ингибиторов 685 из 747 известных биохимических реакций, представленных в метаболической сети Recon 2. Было предсказано, что среднее количество молекул с ингибирующим действием на одну молекулу фермента равно 29, число ферментов, имеющих единственного ингибитора крайне мало, а, например, моноаминоксидазы в среднем имеют 1017 ингибиторных молекул [L.Thiele et al., 2013; M.T.Alam et al., 2017].

Полученные нами экспериментальные данные соотносятся с имеющимися сведениями, указывающими на способность оксалоацетата ингибировать активность ЛДГ. Для постановки представленной в литературе реакции использовались сравнительно высокие концентрации оксалоацетата до 7,5 мМ. Было определено дозозависимое влияние оксалоацетата на

активность ЛДГ, кинетический механизм ингибирования соответствовал неконкурентному типу [M.T.Alam et al., 2017], однако не проводилось исследование влияние оксалоацетата в более низких диапазонах концентраций.

Оксалоацетат, хоть и проявляет ингибирующее воздействие на ЛДГ в диапазоне миллимолярных концентраций, однако, его ингибирующее воздействие на молекулу белка нивелируется тем фактом, что для каждого из этих соединений характерна четкая компартментализация: концентрация оксалоацетата в клетке крайне мала - порядка 2-6 мкмоль/л [E.A.Siess et al., 1984], большая часть его содержится в митохондриях, в то время как лактатдегидрогеназа является цитозольным ферментом. Таким образом, ингибирование ЛДГ оксалоацетатом *in vivo* представляется маловероятным процессом.

Большой интерес, с нашей точки зрения, имеет тот факт, что микромолярная концентрация оксалоацетата, в целом соответствующая его физиологическим значениям, способна стимулировать протекание каталитической реакции и оказывать термостабилизирующее воздействие на структуру белка, как при его плавлении, так и в физиологических условиях. В этом кроется фундаментальный смысл влияния микромолекулярного окружения на протекание метаболических процессов.

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.

Полученные результаты приближают нас к раскрытию функциональных возможностей низкомолекулярных лигандов, химическая структура которых служит предиктором различного рода взаимодействий. С расширением

методологических возможностей постановки экспериментальных работ нам все больше становится известно о регуляторном влиянии малых молекул и появляются перспективы клинического применения имеющихся данных. Вместе с тем, возникают все новые вопросы, цель которых постичь внутреннюю логику молекулярного мира.

ГЛАВА 6.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По прошествии более чем двухсот лет со времен открытия своей структуры лактат все еще остается интригующей молекулой. Сегодня известно, что считавшаяся долгое время тупиковым ответвлением метаболизма и причиной мышечной усталости молекула может быть топливом для многих клеток. Лактат является постоянным и ключевым компонентом внутри- и межклеточного микроокружения, что ставит перед нами вопрос о том, достаточно ли тех знаний, которыми мы владеем, говоря о биологической роли лактата, или эта малая молекула способна проявлять себя в иных ипостасях? Активный интерес к вопросу потенциальных регуляторных функций низкомолекулярных лигандов способствовал взгляду на исследуемый метаболит под новым ракурсом.

Мы обратились к методам моделирования *in silico* для того, чтобы получить ответ на вопрос о том, какой потенциальной биологической активностью может обладать молекула лактата. С применением программы PASS было предсказано наличие 318 фармакологических эффектов, 2108 возможных механизмов действия, 177 метаболически опосредованных действий. Интересным представляется смоделированная способность лактата выступать регулятором иммунных реакций, проявлять иммуномодулирующее, иммуностимулирующее, противовирусное, противовоспалительное действия, а также оказывать антибактериальный эффект (рисунок 6.1). Особую значимость в контексте разработок препаратов для лечения различных новообразований приобретает наличие у лактата противоопухолевого эффекта, спрогнозированного с достаточно высокой степенью вероятности. Также важными свойствами, спрогнозированными с помощью программы PASS, является наличие эффекта стимуляции лейко- и эритропоэза.

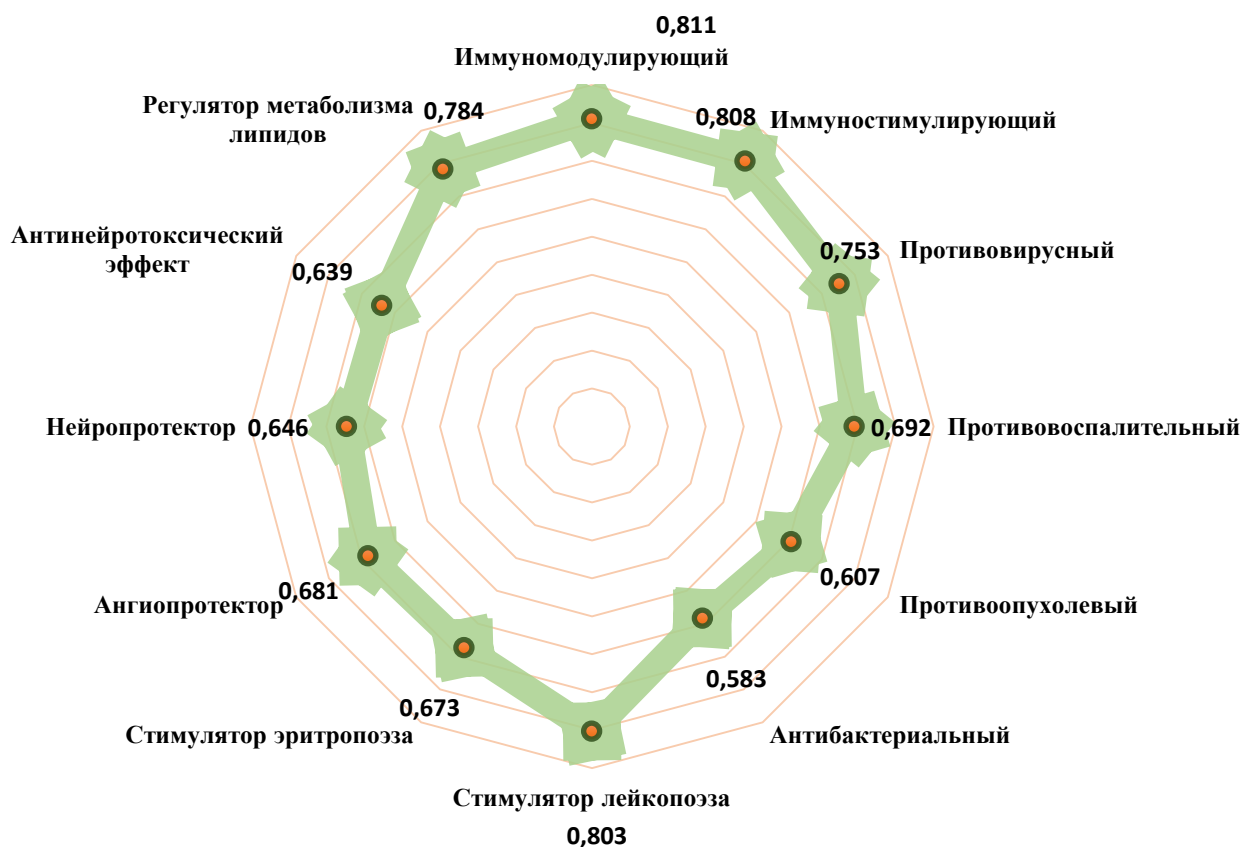


Рисунок 6.1 – Биологические эффекты лактата, смоделированные программой PASS

При оценке молекулярных механизмов действия, предсказанных методом компьютерного моделирования, обращает на себя внимание возможность лактата выступать ингибитором следующих ферментов (рисунок 6.2): пируваткарбоксилазы, глиоксилатредуктазы, лактоназы, фосфоенолпируватмутаза. Также предсказана способность лактата проявлять агонистические и антагонистические потенции в отношении ряда рецепторов. Например, выступать в качестве агониста фактора роста нервов, инсулиноподобного фактора роста, и антагониста рецепторов тиреоидного гормона, фибриногена.



Рисунок 6.2 – Молекулярные механизмы действия лактата, предсказанные программой PASS

Далее мы обратились к программе, способной анализировать и моделировать с высокой степенью вероятности потенциальных белковых партнеров, с которыми может взаимодействовать лактат. Программа STITCH показала наличие 367 белков-кандидатов, степень вероятности взаимодействия с которыми составляет более 0,5. На рисунке 6.3 представлены белки, степень вероятности взаимодействия с которыми составляет более 0,9. Нами была отмечена возможность лактата взаимодействовать со многими рецепторами, среди которых рецептор лактата HCAR1, мускариновые холинергические рецепторы, а также дофаминовые, серотониновые, глутаматные рецепторы. Смоделированные взаимодействия свидетельствуют о потенциальной роли лактата в передаче нервного импульса и наличие особой функции, которую он выполняет, находясь в микроокружении астроцитов и нейронов. Полученные данные согласуются с предсказанным программой PASS нейропротекторным

действием лактата. Вместе с тем, программой STITCH смоделирован еще один потенциальный механизм нейропротекции. Предполагается, что, связываясь с белком MTRNR2L2, метаболит снижает образование преамилоидного пептида, тем самым уменьшая активность нейродегенеративных процессов.

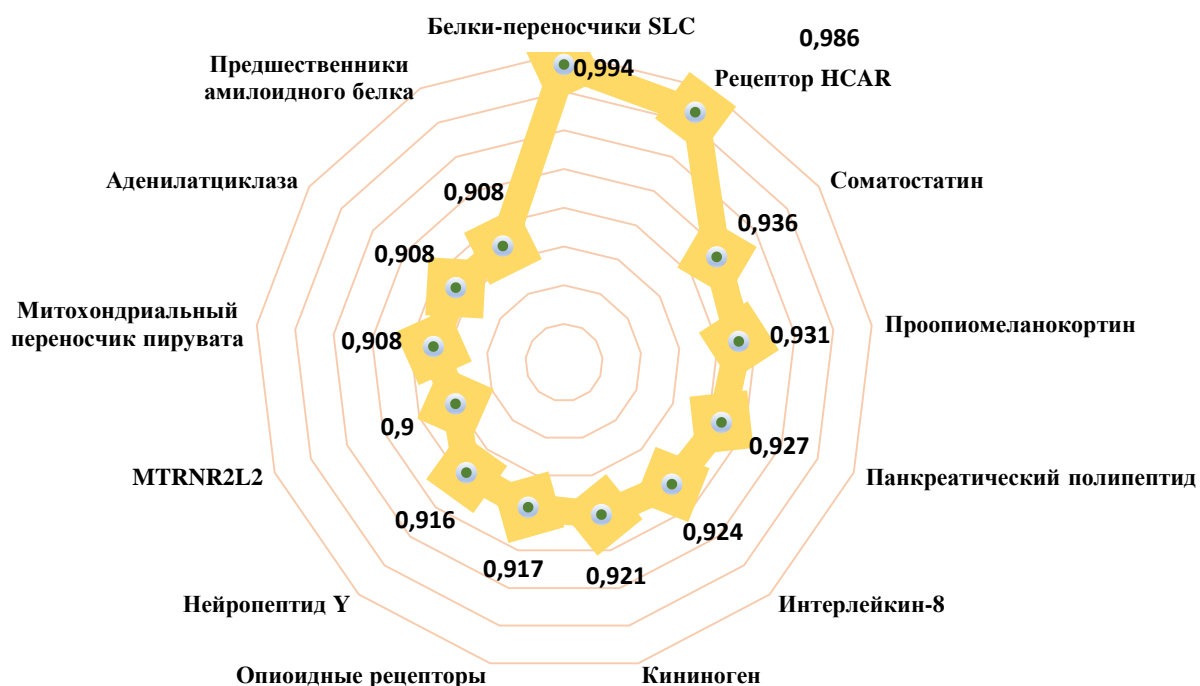


Рисунок 6.3 – Предсказанные программой STITCH белки для взаимодействия с лактатом ($P_a > 0,9$)

Представленные выше данные о прогнозируемой активности лактата, смоделированной в программах PASS и STITCH, позволили разработать новую концепцию понимания потенциальной биологической роли лактата. Проведенный анализ показал, что лактат, вероятно, может проявлять себя как регулятор важнейших метаболических событий, иммунных, в том числе воспалительных реакций, выступать в роли трансммиттера нервных импульсов и гормональных сигналов. Предсказанные эффекты лактата позволяют

говорить о нем не как о «тупиковом метаболите», а как о важнейшем переключателе процессов, протекающих в организме.

Этап компьютерного моделирования, показавший масштаб и многоликость потенциальных эффектов исследуемого метаболита, значительное количество спрогнозированных белковых партнеров, позволил задать вектор дальнейшей экспериментальной работе, первым шагом в которой стало выявление влияния лактата на взаимодействия белок-белковое взаимодействие.

В качестве белковых структур нами были выбраны гликопротеины А и В мембраны эритроцитов (группы крови АВ0), а также естественные и моноклональные антитела. 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 (рисунок 6.4). 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.

Исследование влияния лактата на процессы протекания белок-белкового взаимодействия проводилось с использованием модельной системы на примере реакции антиген-антитело, где в качестве антигенов выступали гликопротеины А и В (группы крови АВ0), а в качестве антител – естественные антитела плазмы крови, а также моноклональные антитела к гликопротеинам А и В. При анализе результатов проведенного наблюдения мы отметили, что антигенные детерминанты А и В проявляют различную чувствительность к введению лактата в экспериментальную систему: антиген А показал меньшую устойчивость, что проявилось в значительном увеличении времени начала агглютинации в сравнении с контролем.

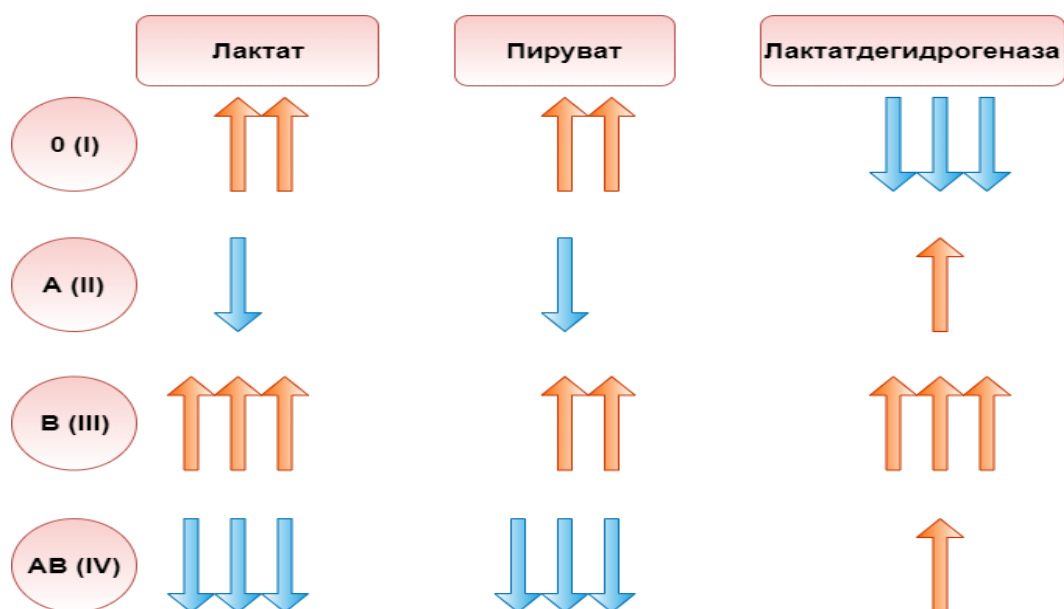


Рисунок 6.4 – Ассоциированность показателей лактатдегидрогеназной каталитической системы в зависимости от групповой принадлежности крови по системе АВ0

Антиген В продемонстрировал большую стабильность при влиянии лактатом, время начала агглютинации изменилось в меньшей степени. Выявленные изменения могут быть объяснены отличием в структурной организации самих антигенов: концевым олигосахаридом антигена А является N-ацетилгалактозамин, в то время как для антигена В -галактоза.

Микрофотографии комплексов антиген-антитело, образованных под влиянием лактата, выявили отличие в площади образованных агглютинатов и объема площади кадра занимаемого ими для антигенов А и В. Комплексы, образованные с антигеном А, характеризуются более крупным размером, многообразием 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.

При добавлении лактата к естественным и моноклональным антителам наблюдается снижение степени агглютинации, при этом анти-В антитела плазмы крови высокочувствительны к введению лактата. Моноклональные антитела также оказались восприимчивы к введению лактата в экспериментальную систему, вместе с тем, не выявлено разницы в ответе между анти-А и анти-В молекулами.

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, отличаясь наличием дополнительной карбоксильной группы.

В ходе нашего исследования мы определяли влияние оксалоацетата на каталитический белок лактатдегидрогеназу. Модельные условия, воспроизводимые в этих экспериментах, благодаря технологии приборов и микрообъему использованных проб, были приближены к условиям *in vivo*. Результаты, полученные с применением метода микрокапиллярного термофореза, подтвердили факт взаимодействия оксалоацетата и лактатдегидрогеназы, также была определена константа диссоциации для данной пары взаимодействующих веществ, которая отражает степень сродства белка и его лиганда - она составила 0,5 мкм, что свидетельствует о наличии достаточно высокого сродства между взаимодействующими молекулами.

Методом дифференциальной сканирующей флуориметрии нами было оценено влияние различных концентраций оксалоацетата на конформационную стабильность лактатдегидрогеназы в температурном градиенте. Было установлено, что внесение оксалоацетата в концентрациях 0,5-16 мкМ по-разному смещает точку наступления температуры плавления белка. Концентрации лиганда 0,5-2 мкМ приводят к увеличению температуры плавления, 16 мкМ концентрация, напротив, снижает термостабильность ЛДГ. При оценке графиков первых производных полученных кривых плавления обращает на себя внимание качественно разная форма пиков (рисунок 6.5): самая глубокая точка соответствует точке плавления белка. Несмотря на то, что вершина пика для 0,5 мкМ и 16 мкМ концентраций смещена незначительно, форма имеющихся пиков отражает разное конформационное состояние молекулы ЛДГ при влиянии этих концентраций оксалоацетата: более низкая концентрация лиганда способствует пребыванию ЛДГ в более свернутом состоянии, а более высокая – наоборот, несколько «разворачивает» молекулу белка.

Нами была проведена оценка влияния оксалоацетата на конформацию лактатдегидрогеназы в физиологическом диапазоне температуры 36,5-37,5°C (рисунок 6.6). Отмечено статистически значимое ($p < 0,001$) отличие во влиянии на конформационное состояние различных концентраций лиганда, что проявлялось различной степенью изменения флуоресценции. Наименьшее значение отношений флуоресценций было отмечено для концентрации оксалоацетата 0,5 мкМ, а наибольшее – для 16 мкМ.

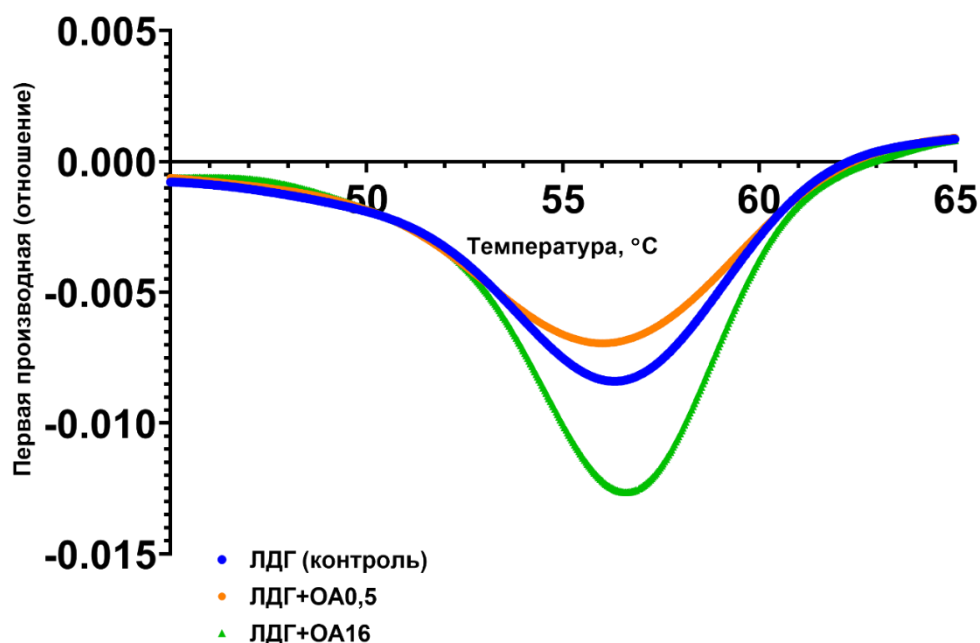


Рисунок 6.5 – Участок первой производной кривой плавления лактатдегидрогеназы при взаимодействии с оксалоацетатом в концентрации 0,5 мкМ и 16 мкМ

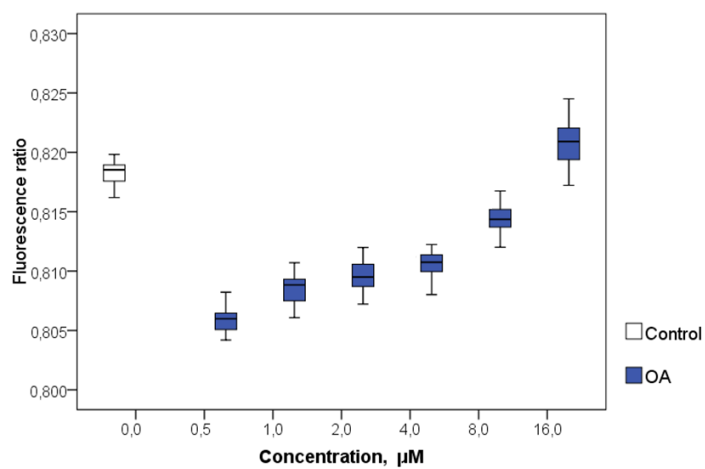


Рисунок 6.6 – Сравнение влияния различных концентраций оксалоацетата на термостабильность ЛДГ при 36,5-37,5°C

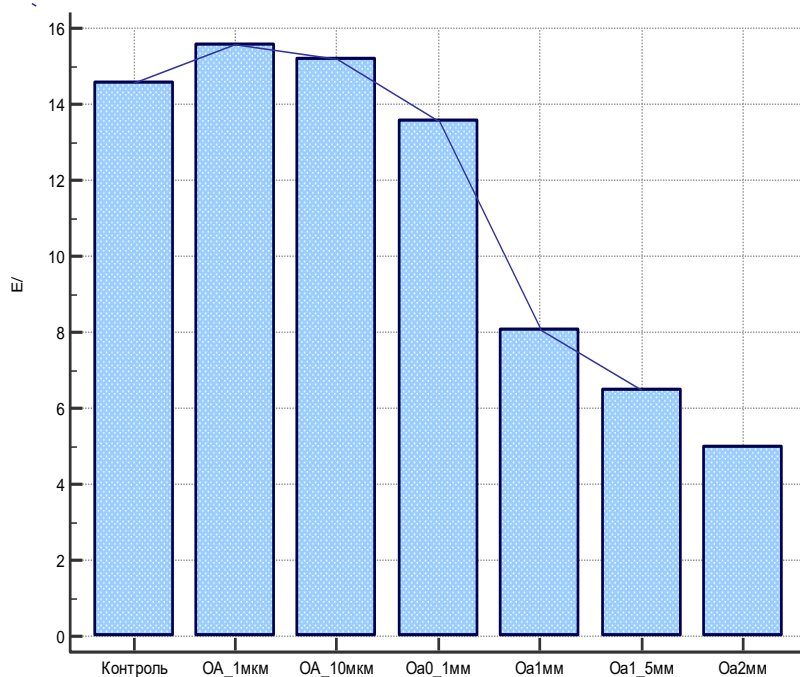


Рисунок 6.7 – Влияние оксалоацетата на активность лактатдегидрогеназы в прямой реакции (пируват-лактат), E/ мг белка

Для ответа на вопрос как связано изменение конформации лактатдегидрогеназы с изменением ее функциональных характеристик мы провели серию экспериментов по исследованию влияния оксалоацетата на комплекс фермент-субстрат в прямой и обратной лактатдегидрогеназной реакции (рисунок 6.7).

Обращает на себя внимание ингибирующее дозозависимое действие оксалоацетата, начиная с концентрация 0,1 мМ, которое достигает своего пика при концентрации 5 мМ, когда наблюдается полное ингибирование активности ЛДГ как в прямой, так и в обратной реакции. Необходимо отметить, что чувствительность ЛДГ в прямой реакции к оксалоацетату оказалась несколько выше, чем в обратной. Возможно, это связано с тем, что равновесие лактатдегидрогеназной реакции сильно смещено в сторону образования лактата, то есть основным субстратом этой реакции является пируват. Оксалоацетат, являясь структурным аналогом пирувата, может оказывать большее влияние именно в прямой реакции. Более низкие

концентрации оксалоацетата 1-10 мкМ оказывают активирующее воздействие на каталитическую систему, что сопровождается увеличением активности ЛДГ относительно контрольной пробы. При этом, влияние 1 мкМ концентрации оксалоацетата более выражено и статистически значимо в сравнении с 10 мкМ концентрацией.

Следует указать, что внутриклеточное содержание оксалоацетата составляет порядка 2-6 мкМ [E.A.Siess et al., 1984], почти вся часть которого сконцентрирована в митохондриях клетки. Полученные данные свидетельствуют о том, что оксалоацетат в физиологической концентрации проявляет себя как активатор каталитического белка ЛДГ и ее стабилизатор при действии температурного фактора. В концентрациях же в несколько раз выше физиологической величины, напротив, оказывает выраженное дестабилизирующее воздействие на конформацию молекулы и ингибирующее – на функцию белка.

Полученные данные демонстрируют широкий функциональный потенциал лактата и оксалоацетата в регуляции внутри и межмолекулярных взаимодействий. Это способствует репозиционированию низкомолекулярных лигандов: они не только участники «метаболического обеспечения процессов», но и регуляторы-переключатели многих реакций. Такой подход представляется многообещающим и эффективным инструментом для выявления новых способов применения малых молекул и соответствует концепции развития прецизионной медицины в век больших массивов данных. Открытый доступ к библиотекам геномов и протеомов, а также к данным о структуре и результатах компьютерного моделирования низкомолекулярных соединений позволяет создавать новые разработки для создания лекарственных средств, платформой которых являются фундаментальные исследования. Малые молекулы - естественные интермедиаты нашего организма, такие как лактат и оксалоацетат, взаимодействуя с белками, могут приводить к изменению скорости протекания химических реакций и энергетического потенциала клеток, что

делает интересным дальнейшее исследование представленных молекул в отношении подходов биоэнергетической медицины. Коррекция внутриклеточных метаболических потоков посредством применения эндогенных интермедиатов может стать новой ступенью в изучении и понимании молекулярных основ нормы и первых патологических изменений клетки в самом начале болезни.

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 рилизинг гормонов, участие в иммунновоспалительных реакциях, а также потенциальное нейропротекторное и противоопухолевое действие.

2. Выявлены характерные группоспецифические особенности лактатдегидрогеназной каталитической системы для лиц с 0 (I)- АВ (IV) группами крови. Наибольшая активность лактатдегидрогеназы, содержания 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 был 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – Аденозинтрифосфат

ЛДГ – Лактатдегидрогеназа

НАД – Никотинамидадениндинуклеотид

НАДФ – Никотинамидадениндинуклеотидфосфат

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D-лактат - маркер бактериального воспаления нативных и протезированных суставов / С. Б. Карбышева, Л. Г. Григоричева, И. В. Жильцов [и др.] // Травматология и ортопедия России. – 2017. – Т. 23, № 2. – С. 6–14.
2. Альфонсова, Е. В. Влияние лактат-ацидоза на состояние системы гемостаза в различных отделах сосудистого русла в опытах *in vivo* / Е. В. Альфонсова // Ученые записки Забайкальского государственного университета. Серия: Биологические науки. – 2016. – Т. 11, № 1. – С. 158–165.
3. Альфонсова, Е. В. Роль экспериментального лактат-ацидоза в развитии структурных нарушений селезенки¹ / Е. В. Альфонсова, Н. В. Бочкарникова // Ученые записки Забайкальского государственного гуманитарно–педагогического университета им. Н. Г. Чернышевского. Серия: Биологические науки. – 2011. – № 1(36). – С. 5–13.
4. Биохимия: учебник для вузов/ под ред. Е.С.Северина - 5-е изд., - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. - 768 с.
5. Бовин, Н. В. Естественные антитела к гликанам (обзор) / Н. В. Бовин // Биохимия. – 2013. – Т. 78, № 7. – С. 1008–1022.
6. Визуализация антиген–антительного взаимодействия с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии / Н. А. Колотьева, Ф. Н. Гильмиярова, П. Е. Тимченко [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 8-5. – С. 713–718.
7. Влияние пирувата на взаимодействие антител с группоспецифичными антигенами эритроцитов / Ф. Н. Гильмиярова, В. М. Радомская, О. А. Гусякова [и др.] // Биомедицинская химия. – 2015. – Т. 61, № 1. – С. 132–140.

8. Влияние прогестерона и эстрогена на скорость агглютинации и андренореактивность эритроцитов беременных женщин и рожениц / В. И. Циркин, М. А. Громова, Д. А. Колчина [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2008. – № 7. – С. 59–60.

9. Влияние прогестерона и эстрогена на скорость агглютинации и андренореактивность эритроцитов беременных женщин и рожениц / В. И. Циркин, М. В. Бышева, Л. В. Чистякова [и др.] // Медицинский альманах. – 2015. – № 4(39). – С. 52–55.

10. Группы крови: биологическая вариабельность метаболизма в норме и патологии / Ф. Н. Гильмиярова, О. А. Гусякова, И. В. Зубова [и др.] // Вятский медицинский вестник. – 2007. – № 4. – С. 90.

11. Дефицит тиамина и его коррекция при критических состояниях / В. В. Ломиворотов, М. Н. Дерягин, М. Н. Абубакиров [и др.] // Вестник анестезиологии и реаниматологии. – 2017. – Т. 14, № 5. – С. 73–81.

12. Дефицит фруктозо-1,6-бифосфатазы: описание первого генетически подтвержденного случая в России / Ю. В. Тихонович, Е. Е. Петряйкина, И. Г. Рыбкина [и др.] // Педиатрия. Журнал им. Г. Н. Сперанского. – 2015. – Т. 94, № 1. – С. 96–99.

13. Дифференциальная сканирующая калориметрия в исследованиях теплофизических характеристик биологических тканей в широком диапазоне температур / А. Г. Белозеров, Ю. М. Березовский, И. А. Королев [и др.] // Международный научно-исследовательский журнал. — 2016. — № 12 (54)— С. 14—20.

14. Жемела, О. Д. РН среды и деформация мембраны эритроцитов в крыс разных возрастных групп в условиях гемической гипоксии / О. Д. Жемела // Вестник проблем биологии и медицины. – 2013. – Т. 2, № 1. – С. 105–107.

15. Жирнов, О. П. Rh-зависимые перестройки в структуре вируса гриппа А / О. П. Жирнов, А. А. Манькин // Вопросы вирусологии. – 2014. – Т. 59, № 3. – С. 41–46.

16. Значения лактата, пирувата и их соотношений у пациентов с сахарным диабетом 1-го типа / Л. И. Колесникова, Б. Я. Власов, С. И. Колесников [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – Т. 61, № 7. – С. 405–407.
17. Использование данных сканирующей калориметрии для диагностики рецидивирующей кривошеи у детей/ А.М.Куркин, Л.А. Гончарова, А.А.Николаев [и др.]// Современные проблемы науки и образования. – 2018. – № 4.–С.1-9.
18. Кишкун, А. А. Руководство по лабораторным методам диагностики / А. А. Кишкун. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 800 с.
19. Колотьева, Н. А. Малые молекулы в изучении особенностей белок-белковых взаимодействий : специальность 03.01.04 «Биохимия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Колотьева Наталия Александровна. – Москва, 2012. – 156 с.
20. Компьютерное предсказание Биологической активности химических веществ: виртуальная хемогеномика / В. В. Поройков, Д. А. Филимонов, Т. А. Глориозова [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2009. – Т. 13, № 1. – С. 137–143.
21. Компьютерное прогнозирование спектров биологической активности химических соединений: возможности и ограничения / Д. А. Филимонов, Д. С. Дружиловский, А. А. Лагунин [и др.] // Biomedical Chemistry: Research and Methods. – 2018. – Т. 1, № 1. – С. e00004.
22. Кондратьева, О. В. Уровень лактата и пирувата в слюне у детей с муковисцидозом и хроническим гастродуоденитом / О. В. Кондратьева, Н. В. Рылова, И. Х. Валеева // Педиатрия. Журнал им. Г. Н. Сперанского. – 2012. – Т. 91, № 4. – С. 163–164.
23. Корнякова, В. В. Активация перекисного окисления липидов в печени крыс при интенсивных физических нагрузках: механизмы развития, коррекция / В. В. Корнякова, В. Д. Конвай, Е. В. Фомина // Омский научный вестник. – 2011. – № 1(104). – С. 204–208.

24. Минорные компоненты метаболизма в регуляции белок-белковых взаимодействий / Ф. Н. Гильмиярова, В. М. Радомская, Е. А. Рыскина [и др.] // Медицинский альманах. – 2013. – № 2(26). – С. 181–184.

25. Митохондриальная энцефалопатия с инсультоподобными эпизодами и лактат-ацидозом (синдром melas): критерии диагностики, особенности эпилептических приступов и подходы к лечению на примере клинического случая / М. А. Ямин, И. В. Черникова, Л. В. Арасланова [и др.] // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2017. – № 4. – С. 65–69.

26. M–Холинореактивность эритроцитов небеременных и беременных женщин, определяемая по изменению скорости агглютинации эритроцитов под влиянием ацетилхолина / А. И. Стрельникова, В. И. Циркин, А. В. Крысова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 154, № 8. – С. 140–143.

27. Мягкова, М. А. Естественные антитела и их физиологические функции / М. А. Мягкова, В. С. Морозова // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2014. – № 3. – С. 75–81.

28. Определение концентрации лактата в амниотической жидкости и в раннем неонатальном периоде при перинатальной гипоксии / Ю. В. Кореновский, Т. Н. Чугунова, О. Н. Фильчакова [и др.] // Казанский медицинский журнал. – 2013. – Т. 94, № 5. – С. 704–706.

29. 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. – Т. 64, № 3. – С. 170–175.

30. Полетаев, А. Б. Иммунофизиология и иммунопатология / А. Б. Полетаев. – Москва : МИА, 2008. – 208 с.

31. Поройков, В. В. Компьютерное предсказание биологической активности химических веществ: виртуальная хемогеномика / В. В. Поройков, Д. А. Филимонов, Т. А. Глориозова [и др.] // Информационный вестник ВОГИС. – 2009. – Т. 13, № 1. – С. 137–143.

32. Поройков, В. В. Компьютерное предсказание биологической активности веществ: пределы возможного / В. В. Поройков // Химия в России. – 1999. – № 2. – С. 8–12.
33. Рыскина, Е. А. Особенности влияния низкомолекулярных метаболитов на взаимодействие белков с лигандами : специальность 03.01.04 «Биохимия» : диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / Рыскина Елена Анатольевна. – Москва, 2017. – 312 с.
34. Семенов, Д. М. D-лактат как маркер дисбиотических и воспалительных заболеваний нижнего отдела половых путей у женщин / Д. М. Семенов // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2016. – Т. 15, № 4. – С. 40–45.
35. Системное кровообращение, микроциркуляция и гемореология: Материалы международной научной конференции / А. И. Володченко, Е. А. Колокольцева, В. И. Циркин [и др.]. – Ярославль : Изд-во ЯГПУ, 2011. – С.122.
36. Справочник по лабораторным методам исследования / под ред. Л. А. Даниловой, Н. П. Раменская, О. Б. Башарина [и др.]. – Санкт-Петербург : Питер, 2003. – 703 с.
37. Стрюк, Р. И. Адренореактивность и сердечно-сосудистая система / Р. И. Стрюк, И. Г. Длусская. – Москва : Медицина, 2003. – 157 с.
38. Филимонов, Д. А. Прогноз спектра биологической активности органических соединений / Д. А. Филимонов, В. В. Поройков // Российский химический журнал. – 2006. – Т. 50, № 2. – С. 66–75.
39. Хейль, В. Референтные пределы у взрослых и детей / В. Хейль, Р. Коберштейн, Б. Цавта. – Москва : Лабпресс, 2001. – 176 с.
40. Шатова, О. П. Влияние лактата на активность аденозиндезаминазы / О. П. Шатова, Е. В. Хомутов, И. И. Зинкович // Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2009. – Т. 9, вип. 4. – С. 163–166.
41. Штейн, Г. И. Руководство по конфокальной микроскопии / Г. И. Штейн. – Санкт-Петербург : ИНЦ РАН, 2007. – 77 с.

42. SM-TF: a structural database of small molecule-transcription factor complexes / X. Xu, Z. Ma, H. Sun [et al.] // *J. Comput. Chem.* – 2016. – Vol. 37. – P. 1559–1564.
43. 4D-QSAR: perspectives in drug design / C. H. Andrade, K. F. M. Pasqualoto, E. I. Ferreira [et al.] // *Molecules.* – 2010. – Vol. 15(5). – P. 3281–3294.
44. A community-driven global reconstruction of human metabolism / I. Thiele [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 31. – P. 419–425.
45. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm / M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 1996. – Vol. 261(3). – P. 470–489.
46. A new chemical approach to human ABO histo-blood group type 2 antigens / A. Hara, A. Imamura, H. Ando [et al.] // *Molecules.* – 2013. – Dec. 31, Vol. 19(1). – P. 414–437.
47. A novel KLF4/LDHA signaling pathway regulates aerobic glycolysis in and progression of pancreatic cancer / M. Shi, J. Cui, J. Du [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2014. – Vol. 20. – P. 4370–4380.
48. A review of network-based approaches to drug repositioning / M. Lotfi Shahreza, N. Ghadiri, S. R. Mousavi [et al.] // *Brief Bioinform.* – 2018. – Sep. 28. – Vol. 19(5). – P. 878–892.
49. A Virtual Screening Study for Lactate Dehydrogenase 5 Inhibitors by Using a Pharmacophore-based Approach / T. Tuccinardi, G. Poli, I. Corchia [et al.] // *Mol. Inform.* – 2016. – Vol. 35. – P. 434–439.
50. Acid-sensing ion channels in rat hypothalamic vasopressin neurons of the supraoptic nucleus / T. Ohbuchi, K. Sato, H. Suzuki [et al.] // *J. Physiol.* – 2010. – Jun. 15, Vol. 588(Pt 12). – P. 2147–2162.
51. Allain FHT: Systematic identification of protein–metabolite interactions in complex metabolite mixtures by ligand-detected nuclear magnetic resonance spectroscopy / Y. V. Nikolaev, K. Kochanowski, H. Link [et al.] // *Biochemistry.* – 2016. – Vol. 55. – P. 2590–2600.

52. Ambient but not local lactate underlies neuronal tolerance to prolonged glucose deprivation / C. Sobieski, N. Warikoo, H. J. Shu [et al.] // *PLoS One*. – 2018. – Apr. 4, Vol. 13(4). – P. e0195520.
53. An integrative evolution theory of histo-blood group ABO and related genes / F. Yamamoto, E. Cid, M. Yamamoto [et al.] // *Scientific Reports*. – 2014. – Vol. 4. – P. 6601.
54. Analysis of pharmacology data and the prediction of adverse drug reactions and off-target effects from chemical structure / A. Bender, J. Scheiber, M. Glick [et al.] // *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery*. – 2007. – Vol. 2, N 6. – P. 861–873.
55. Anaplerotic Accumulation of Tricarboxylic Acid Cycle Intermediates as Well as Changes in Other Key Metabolites During Heterotopic Ossification / E. L. Davis, E. A. Salisbury, E. Olmsted-Davis [et al.] // *J. Cell. Biochem.* –2016. – Apr., Vol. 117(4). – P. 1044–1053.
56. Antibacterial activity and biological performance of a novel antibacterial coating containing a halogenated furanone compound loaded poly(L-lactic acid) nanoparticles on microarc-oxidized titanium / Y. Cheng, X. Zhao, X. Liu [et al.] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2015. – Vol. 10. – P. 727–737.
57. Application of a high-throughput relative chemical stability assay to screen therapeutic protein formulations by assessment of conformational stability and correlation to aggregation propensity / J. M. Rizzo, S. Shi, Y. Li [et al.] // *Pharm. Sci.* – 2015. – Vol. 104(5). – P. 1632–1640.
58. Association of ABO Blood Group System and Anti-Sperm Antibody with Male Infertility / Elham Abdollahi, Fataneh Tavasolian, Mohammad Ali Esmaili [et al.] // *International Journal of Medical Laboratory*. – 2014. – Vol. 1(1). – P. 54–60.
59. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility / G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom [et al.] // *J. Comput. Chem.* – 2009. – Vol. 30(16). – P. 2785–2791.

60. Avogadro: an advanced semantic chemical editor visualization, and analysis platform / M. D. Hanwell, D. E. Curtis, D. C. Lonie [et al.] // *Journal of Cheminformatics*. – 2012. – Vol. 4(1). – P. 17.
61. Avrameas, S. Natural autoantibodies: the other side of the immune system / S. Avrameas, T. Ternynck // *Res. Immunol.* – 1995. – Vol. 146(4–5). – P. 235–248.
62. Bakker, J. Clinical use of lactate monitoring in critically ill patients / J. Bakker, M. W. Nijsten, T. C. Jansen // *Ann. Intensive Care*. – 2013. – Vol. 3(1). – P. 12.
63. BALL - biochemical algorithms library 1.3. / A. Hildebrandt, A. Dehof, A. Rurainski [et al.] // *BMC Bioinformatics*. – 2010. – Vol. 11(1). – P. 531.
64. Banerjee, A. Lactate mediates neuroprotection against ischaemia by increasing TREK1 channel expression in rat hippocampal astrocytes in vitro / A. Banerjee, S. Ghatak, S. K. Sikdar // *J. Neurochem.* – 2016. – Jul., Vol. 138(2). – P. 265–281.
65. Barros, L. F. Metabolic signaling by lactate in the brain / L. F. Barros // *Trends Neurosci.* – 2013. – Jul., Vol. 36(7). – P. 396–404.
66. Basigin (CD147) is the target for organomercurial inhibition of monocarboxylate transporter isoforms 1 and 4: the ancillary protein for the insensitive MCT2 is EMBIGIN (gp70) / M. C. Wilson, D. Meredith, J. E. Fox [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Jul. 22, Vol. 280(29). – P. 27213–27221.
67. Baumgarth, N. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion / N. Baumgarth, J. W. Tung, L. A. Herzenberg // *Springer Semin Immunopathol.* – 2005. – Vol. 26(4). – P. 347–362.
68. Bender, A. Molecular similarity: a key technique in molecular informatics / A. Bender, R. C. Glen // *Org. Biomol. Chem.* – 2004. – Vol. 2. – P. 3204–3218.

69. Bergersen, L. H. Lactate transport and signaling in the brain: potential therapeutic targets and roles in body–brain interaction / L. H. Bergersen // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2015. – Vol. 35(2). – P. 176–185.
70. Biswas, S. K. Metabolic reprogramming of immune cells in cancer progression / S. K. Biswas // *Immunity*. – 2015. – Vol. 43. – P. 435–449.
71. Blood lactate is an important energy source for the human brain / G. van Hall, M. Strømstad, P. Rasmussen [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2009. – Vol. 29. – P. 1121–1129.
72. Blood type, ABO genetic variants, and ovarian cancer survival / G. D. Cozzi, R. T. Levinson, H. Toole [et al.] // *PLoS ONE*. – 2017. – Vol. 12(4). – P. e0175119.
73. Bluth, M. H. Introduction: Molecular Medicine in the Common Era / M. H. Bluth // *Clinics in Laboratory Medicine*. – 2018. – Vol. 38(2). – P. 209–213.
74. Borregaard, N. Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis / N. Borregaard, T. Herlin // *J. Clin. Invest.* – 1982. – Vol. 70(3). – P. 550–557.
75. Bouteldja, N. The biochemical basis of hereditary fructose intolerance / N. Bouteldja, D. J. Timson // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2010. – Vol. 33(2). – P. 105–112.
76. Boyden, S. V. “Natural Antibodies and the Immune Response” / S. V. Boyden // *Advances in Immunology* / ed by F. J. Dixon, J. H. Hhumphre. – New York : Academic. Press, 1966. – Vol. 5 – P. 1–28.
77. Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles / G. R. Gordon, H. B. Choi, R. L. Rungta [et al.] // *Nature*. – 2008. – Dec. 11, Vol. 456(7223). – P. 745–749.
78. Brandão de Mattos C. C. Histo-blood group carbohydrates as facilitators for infection by *Helicobacter pylori* / C. C. Brandão de Mattos, L. C. de Mattos // *Infect. Genet. Evol.* – 2017. – Sep., Vol. 53. – P. 167–174.

79. BRENDA in 2017: new perspectives and new tools in BRENDA / S. Placzek, I. Schomburg, A. Chang [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – Jan., Vol. 45. – P. D380–D388.
80. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth / R. J. Deberardinis, N. Sayed, D. Ditsworth [et al.] // *Curr. Opin. Genet Dev.* – 2008. – Vol. 18. – P. 54–61.
81. Brooks, G. A. Lactate shuttles in nature / G. A. Brooks // *Biochem. Soc. Trans.* – 2002. – Apr., Vol. 30(2). – P. 258–264.
82. Brooks, G. A. The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory / G. A. Brooks // *Cell. Metab.* – 2018. – Apr. 3, Vol. 27(4). – P. 757–785.
83. Brooks, G. A. What does glycolysis make and why is it important? / G. A. Brooks // *J. Appl. Physiol.* – 2010. – Vol. 108(6). – P. 1450–1451.
84. Brunori, M. Molecular medicine - To be or not to be / M. Brunori, S. Gianni // *Biophys. Chem.* – 2016. – Jul.-Aug., Vol. 214-215. – P. 33–46.
85. Bryksin, A. V. Role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in vesicular transport from Golgi apparatus to endoplasmic reticulum / A. V. Bryksin, P. P. Laktionov // *Biochemistry (Moscow)*. – 2008. – Jun., Vol. 73(6). – P. 619–625.
86. Burgner, J. W. On the origin of the lactate dehydrogenase induced rate effect / J. W. Burgner, W. J. Ray // *Biochemistry*. – 1984. – Jul. 31, Vol. 23(16). – P. 3636–3648.
87. Burke, R. E. Lactate dehydrogenase in estrogen-responsive human breast cancer cells / R. E. Burke, S. C. Harris, W. L. McGuire // *Cancer Res.* – 1978. – Vol. 38. – P. 2773–2776.
88. Burslem, G. M. Small-Molecule Modulation of Protein Homeostasis / G. M. Burslem, C. M. Crews // *Chem. Rev.* – 2017. – Vol. 117(17). – P. 11269–11301.

89. Butterfield, D. A. Oxidatively modified glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Alzheimer's disease: many pathways to neurodegeneration / D. A. Butterfield, S. S. Hardas, M. L. Lange // *J. Alzheimer's Dis.* – 2010. – Vol. 20. – P. 369–393.
90. Ca^{2+} signals of astrocytes are modulated by the NAD^+/NADH redox state / R. P. Requardt, P. G. Hirrlinger, F. Wilhelm [et al.] // *J. Neurochem.* – 2012. – Mar., Vol. 120(6). – P. 1014–1025.
91. Cancer-generated lactic acid: a regulatory, immunosuppressive metabolite? / S. Y. C. Choi, C. C. Collins, P. W. Gout [et al.] // *The Journal of Pathology.* – 2013. – Vol. 230(4). – P. 350–355.
92. Cantelmo, A. R. Endothelial Metabolism Driving Angiogenesis: Emerging Concepts and Principles / A. R. Cantelmo, A. Brajic, P. Carmeliet // *Cancer. J.* – 2015. – Vol. 21(4). – P. 244–249.
93. Cell state-specific metabolic dependency in hematopoiesis and leukemogenesis / Y. H. Wang, W. J. Israelsen, D. Lee [et al.] // *Cell.* – 2014. – Vol. 158(6). – P. 1309–1323.
94. Cellular and metabolic origins of flavoprotein autofluorescence in the cerebellar cortex in vivo / K. C. Reinert, W. Gao, G. Chen [et al.] // *Cerebellum.* – 2011. – Sep., Vol. 10(3). – P. 585–599.
95. Cha, S. H. Central lactate metabolism suppresses food intake via the hypothalamic AMP kinase/malonyl-CoA signaling pathway / S. H. Cha, M. D. Lane // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2009. – Aug. 14, Vol. 386(1). – P. 212–216.
96. Chemogenomic data analysis: prediction of small-molecule targets and the advent of biological fingerprints / A. Bender, D. W. Young, J. L. Jenkinsa [et al.] // *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening.* – 2007. – Sep., Vol. 10(8). – P. 719–731.
97. Christen, P. Moving beyond the genome with computer modeling / P. Christen // *Per. Med.* – 2018. – May 1, Vol. 15(3). – P. 145–148.

98. Circadian rhythm of redox state regulates excitability in suprachiasmatic nucleus neurons / T. A. Wang, Y. V. Yu, G. Govindaiah [et al.] // *Science*. – 2012. – Aug. 17, Vol. 337(6096). – P. 839–842.
99. Clark, I. A. Amyloid β : one of three danger-associated molecules that are secondary inducers of the proinflammatory cytokines that mediate Alzheimer's disease / I. A. Clark, B. Vissel // *British Journal of Pharmacology*. – 2015. – Vol. 172(15). – P. 3714–3727.
100. c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth / H. Shim, C. Dolde, B. C. Lewis [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1997. – Vol. 94. – P. 6658–6663.
101. Collecting and assessing human lactate dehydrogenase-A conformations for structure-based virtual screening / R. Buonfiglio, M. Ferraro, F. Falchi [et al.] // *J. Chem. Inf. Model*. – 2013. – Vol. 53. – P. 2792–2797.
102. Comparative metabolic flux profiling of melanoma cell lines: beyond the Warburg effect / D. A. Scott, A. D. Richardson, F. V. Filipp [et al.] // *The Journal of biological chemistry*. – 2011. – Dec. 9, Vol. 286(49). – P. 42626–42634.
103. Comprehensive review on lactate metabolism in human health / M. Adeva-Andany, M. López-Ojén, R. Funcasta-Calderón [et al.] // *Mitochondrion*. – 2014. – Jul., Vol. 17. – P. 76–100.
104. Correlation between serum lactate dehydrogenase and stem cell mobilization / K. Egan, V. Singh, A. Gidron [et al.] // *Bone Marrow Transplant*. – 2007. – Vol. 40. – P. 931–934.
105. Cossins, B. P. Small Molecule Targeting of Protein-Protein Interactions through Allosteric Modulation of Dynamics / B. P. Cossins, A. D. Lawson // *Molecules*. – 2015. – Sep. 10, Vol. 20(9). – P. 16435-16445.
106. Crawley, M.J. *The R Book*. – England: John Wiley & Sons, Ltd., 2007. – 940 p.
107. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG / M. Kanehisa, S. Goto, Y. Sato [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – Jan., Vol. 42(Database issue). – P. D199–D205.

108. Design and synthesis of novel lactate dehydrogenase A inhibitors by fragment-based lead generation / R. A. Ward, C. Brassington, A. L. Breeze [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 55. – P. 3285–3306.

109. Determination of the lactate threshold by means of salivary biomarkers: chromogranin A as novel marker of exercise intensity / O. L. Bocanegra, M. M. Diaz, R. R. Teixeira // *Eur. J. Appl. Physiol.* – 2012. – Sep., Vol. 112(9). – P. 3195–3203.

110. Determining the conformational stability of a protein from urea and thermal unfolding curves / G. R. Grimsley, S. R. Trevino, R. L. Thurlkill [et al.] // *Curr. Protoc. Protein Sci.* – 2013. – Vol. 71(1). – P. 28.4.1–28.4.14.

111. Development of quantitative structure activity relationship (QSAR) model for disinfection byproduct (DBP) research: A review of methods and resources / B. Chen, T. Zhang, T. Bond [et al.] // *J. Hazard Mater.* – 2015. – Dec. 15, Vol. 299. – P. 260–279.

112. Diether, M. Towards detecting regulatory protein-metabolite interactions / M. Diether, U. Sauer // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2017. – Oct., Vol. 39. – P. 16–23.

113. Direct identification of ligand-receptor interactions on living cells and tissue / A. P. Frei, O. Y. Jeon, S. Kilcher [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 30. – P. 997–1001.

114. Distilling the essential features of a protein surface for improving protein-ligand docking, scoring, and virtual screening / M. I. Zavodszky, P. C. Sanschagrín, R. S. Korde [et al.] // *J. Comput. Aided. Mol. Des.* – 2002. – Vol. 16(12). – P. 883–902.

115. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases / T. J. A. Ewing, S. Makino, A. G. Skillman [et al.] // *J. Comput. Aided. Mol. Des.* – 2001. – Vol. 15(5). – P. 411–428.

116. Drug Design for CNS Diseases: Polypharmacological Profiling of Compounds Using Cheminformatic, 3D-QSAR and Virtual Screening Methodologies / K. Nikolic, L. Mavridis, T. Djikic [et al.] // *Frontiers in Neuroscience*. – 2016. – Jun. 10, Vol. 10. – P. 265.

117. Effect of glutamate and blood glutamate scavengers oxaloacetate and pyruvate on neurological outcome and pathohistology of the hippocampus after traumatic brain injury in rats / A. Zlotnik, I. Sinelnikov, B. F. Gruenbaum [et al.] // *Anesthesiology*. – 2012. – Vol. 116. – P. 73–83.

118. Effect of MCI-154, a calcium sensitizer, on calcium sensitivity of myocardial fibers in endotoxic shock rats / M. J. Ming, D. Hu, H. S. Chen [et al.] // *Shock*. – 2000. – Dec., Vol. 14(6). – P. 652–656.

119. Effect of severe injury and critical illness on high-energy phosphates in human liver and muscle / K. Y. Liaw, T. C. Wei, S. C. Hsu [et al.] // *J. Trauma Injury Infect. Crit. Care*. – 1985. – Vol. 25. – P. 628–633.

120. Effects of N-terminal deletion mutation on rabbit muscle lactate dehydrogenase / Y. Zheng, S. Guo, Z. Guo [et al.] // *Biochemistry (Mosc)*. – 2004. – Vol. 69. – P. 401–406.

121. Egeblad, M. Tumors as organs: Complex tissues that interface with the entire organism / M. Egeblad, E. S. Nakasone, Z. Werb // *Dev. Cell*. – 2010. – Vol. 6. – P. 884–901.

122. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer / D. M. Brizel, T. Schroeder, R. L. Scher [et al.] // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2001. – Vol. 51. – P. 349–353.

123. Elowitz, M. Build life to understand it / M. Elowitz, W. A. Lim // *Nature*. – 2010. – Dec. 16, Vol. 468(7326). – P. 889–890.

124. Elucidation of signaling and functional activities of an orphan GPCR, GPR81/ H. Ge, J. Weiszmann, J. D. Reagan [et al.] // *J. Lipid. Res.* – 2008. – Apr., Vol. 49(4). – P. 797–803.

125. Endothelial cell response to lactate: implication of PAR modification of VEGF / V. B. Kumar, R. I. Viji, M. S. Kiran [et al.] // *Journal of cellular physiology*. – 2007. – May, Vol. 211(2). – P. 477–485.
126. Enhanced citrate synthase activity in human pancreatic cancer / B. Schlichtholz, J. Turyn, E. Goyke [et al.] // *Pancreas*. – 2005. – Vol. 30. – P. 99–104.
127. Ensembl 2013 / P. Flicek, I. Ahmed, M. R. Amode [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – Jan., Vol. 41. – P. D48–D55.
128. Epker, J. L. Accidental methanol ingestion: case report / J. L. Epker, J. Bakker // *BMC Emerg. Med.* – 2010. – Vol. 10(1). – P. 3.
129. ERR α -Regulated Lactate Metabolism Contributes to Resistance to Targeted Therapies in Breast Cancer / S. Park, C. Y. Chang, R. Safi [et al.] // *Cell. Rep.* – 2016. – Apr. 12, Vol. 15(2). – P. 323–335.
130. Expression profiling in progressive stages of fumarate-hydratase deficiency: the contribution of metabolic changes to tumorigenesis / H. Ashrafiyan, L. O’Flaherty, J. Adam [et al.] // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 70. – P. 9153–9165.
131. Fantin, V. R. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance / V. R. Fantin, J. St-Pierre, P. Leder // *Cancer Cell*. – 2006. – Jun., Vol. 9(6). – P. 425–434.
132. Findlay, J. W. Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays / J. W. Findlay, R. F. Dillard // *AAPS J.* – 2007. – Vol. 9. – P. 260–267.
133. Firth, J. D. Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements / J. D. Firth, B. L. Ebert, P. J. Ratcliffe // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270. – P. 21021–21027.
134. FOXM1 promotes the Warburg effect and pancreatic cancer progression via transactivation of LDHA expression / M. Shi, D. Xie, D. Wei [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2014. – Vol. 20. – P. 2595–2606.
135. FOXM1-LDHA signaling promoted gastric cancer glycolytic phenotype and progression / W. Jiang, F. Zhou, N. Li [et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 6756–6763.

136. Gardner, D. K. Lactate production by the mammalian blastocyst: Manipulating the microenvironment for uterine implantation and invasion? / D. K. Gardner // *Bioessays*. – 2015. – Vol. 37(4). – P. 364–371.
137. Gaussian docking functions / M. R. McGann, H. R. Almond, A. Nicholls [et al.] // *Biopolymers*. – 2003. – Vol. 68(1). – P. 76–90.
138. Peter, J.B. Autoantibodies / J.B. Peter, Y. Shoenfeld // Amsterdam: Elsevier, P. 880.
139. Geskin, L. J. Monoclonal Antibodies / L. J. Geskin // *Dermatologic Clinics*. – 2015. – Oct., Vol. 33(4). – P. 777–786.
140. Gillespie, I. Update: Clinical Use of Plasma Lactate / I. Gillespie, P. G. Rosenstein, D. Hughes // *Vet. Clin. North Am. Small. Anim. Pract.* – 2017. – Mar., Vol. 47(2). – P. 325–342.
141. Gladden, L. B. Current trends in lactate metabolism: introduction / L. B. Gladden // *Med. Sci. Sports Exerc.* – 2008. – Mar., Vol. 40(3). – P. 475–476.
142. Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex / B. Voutsinos-Porche, G. Bonvento, K. Tanaka [et al.] // *Neuron*. – 2003. – Jan. 23, Vol. 37(2). – P. 275–286.
143. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy / R. A. Friesner, J. L. Banks, R. B. Murphy [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2004. – Vol. 47(7). – P. 1739–1749.
144. Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate / S. Hui, J. M. Ghergurovich, R. J. Morscher [et al.] // *Nature*. – 2017. – Nov. 2, Vol. 551(7678). – P. 115–118.
145. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity / U. Fünfschilling, L. M. Supplie, D. Mahad [et al.] // *Nature*. – 2012. – Apr. 29, Vol. 485(7399). – P. 517–521.
146. Goshu, A. T. Mathematical Modelling of Population Growth: The Case of Logistic and Von Bertalanffy Models / A. T. Goshu, P. R. Koya // *AJTAS*. – 2013. – Vol. 2(6). – P. 268–272.

147. GPR81, a Cell-Surface Receptor for Lactate, Regulates Intestinal Homeostasis and Protects Mice from Experimental Colitis / P. Ranganathan, A. Shanmugam, D. Swafford [et al.] // *J. Immunol.* – 2018. – Mar 1, Vol. 200(5). – P. 1781–1789.

148. Gray, L. R. Regulation of pyruvate metabolism and human disease / L. R. Gray, S. C. Tompkins, E. B. Taylor // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2014. – Jul., Vol. 71(14). – P. 2577–25604.

149. Grimm, M. Increased LDH5 expression is associated with lymph node metastasis and outcome in oral squamous cell carcinoma / M. Grimm, D. Alexander, A. Munz [et al.] // *Clin. Exp. Metastasis.* – 2013. – Vol. 30. – P. 529–540.

150. Gurevich, V. V. Synthetic biology with surgical precision: targeted reengineering of signaling proteins / V. V. Gurevich, E. V. Gurevich // *Cell. Signal.* – 2012. – Oct., Vol. 24(10). – P. 1899–1908.

151. Guzman, M. I. Photo-production of lactate from glyoxylate: how minerals can facilitate energy storage in a prebiotic world / M. I. Guzman, S. T. Martin // *Chem. Commun. (Camb).* – 2010. – Apr. 7, Vol. 46(13). – P. 2265–2267.

152. Halestrap, A. P. The Monocarboxylate Transporter Family-Structure and Functional Characterization / A. P. Halestrap // *IUBMB Life.* – 2012. – Jan., Vol. 64(1). – P. 1–9.

153. Held-Warmkessel, J. Lactic acidosis in patients with cancer / J. Held-Warmkessel, D. D. Dell // *Clin. J. Oncol. Nurs.* – 2014. – Oct., Vol. 18(5). – P. 592–594.

154. Hemodynamic consequences of severe lactic acidosis in shock states: from bench to bedside / A. Kimmoun, E. Novy, T. Auchet [et al.] // *Critical Care.* – 2015. – Vol. 19(1). – P. 175.

155. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers / S. Walenta, M. Wetterling, M. Lehrke [et al.] // *Cancer Res.* – 2000. – Vol. 60. – P. 916–921.

156. High-resolution structures of the IgM Fc domains reveal principles of its hexamer formation / R. Müller, M. A. Gräwert, T. Kern [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2013. – Vol. 110(25). – P. 10183–10188.
157. Hitchcock, S. A. Structure - Brain Exposure Relationships / S. A. Hitchcock, L. D. Pennington // *J. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 49(26). – P. 7559–7583.
158. Hopkins, A. L. The Druggable Genome / A. L. Hopkins, C. R. Groom // *Nat. Rev. Drug Discovery*. – 2002. – Vol. 1(9). – P. 727.
159. Hopper, K. A case-based review of a simplified quantitative approach to acid-base analysis / K. Hopper, S. Haskins // *J. Vet. Emerg. Crit. Care*. – 2008. – Vol. 18(5). – P. 9.
160. Huckabee, W. E. Relationships of pyruvate and lactate during anaerobic metabolism. I. Effects of infusion of pyruvate or glucose and of hyperventilation / W. E. Huckabee // *J. Clin. Invest.* – 1958. – Vol. 37(2). – P. 244–254.
161. Hughes-Jones, N. C. The effect of ficin on the reaction between anti-D and red cells / N. C. Hughes-Jones, B. Gardner, R. Telford // *Vox Sang.* – 1964. – Vol. 9. – P. 175–182.
162. Human group C rotavirus VP8*s recognize type A histo-blood group antigens as ligands / X. Sun, L. Qi, J. Wang, D. Li [et al.] // *J. Virol.* – 2018. – May 14, Vol. 92(11). – pii: e00442-18.
163. Hypocholesterolemic effects of lactic acid-fermented soymilk on rats fed a high cholesterol diet / M. Kobayashi, R. Hirahata, S. Egusa [et al.] // *Nutrients*. – 2012. – Vol. 4(9). – P. 1304–1316.
164. Hypoxia and exercise provoke both lactate release and lactate oxidation by the human brain / M. Overgaard, P. Rasmussen, A. M. Bohm [et al.] // *FASEB J.* – 2012. – Vol. 26. – P. 3012–3020.

165. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1 / G. L. Semenza, B. H. Jiang, S. W. Leung [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271. – P. 32529–32537.

166. Hypoxia-induced alteration of mitochondrial genes in cardiomyocytes: role of Bnip3 and Pdk1 / B. Jian, D. Wang, D. Chen [et al.] // *Shock.* – 2010. – Aug., Vol. 34(2). – P. 169–175.

167. Identification of putative c-Myc-responsive genes: characterization of rcl, a novel growth-related gene / H. Shim, Q. Li, C. S. Wu [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 1997. – Vol. 17. – P. 4967–4978.

168. Impaired myocardial metabolic reserve and substrate selection flexibility during stress in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy / D. Neglia, A. De Caterina, P. Marraccini [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2007. – Vol. 293. – P. H3270–H3278.

169. Improved protein-ligand docking using GOLD / M. L. Verdonk, J. C. Cole, M. J. Hartshorn [et al.] // *Protein Struct Funct. Genet.* – 2003. – Vol. 52(4). – P. 609–623.

170. Increased aerobic glycolysis through beta2 stimulation is a common mechanism involved in lactate formation during shock states / B. Levy, O. Desebbe, C. Montemont [et al.] // *Shock.* – 2008. – Vol. 30(4). – P. 417–421.

171. Inhibition of LDH-A by oxamate induces G2/M arrest, apoptosis and increases radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells / X. Zhai, Y. Yang, J. Wan [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2013. – Vol. 30. – P. 2983–2991.

172. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells / K. Fischer, P. Hoffmann, S. Voelkl [et al.] // *Blood.* – 2007. – May 1, Vol. 109(9). – P. 3812–3819.

173. Iwai, M. Mechanism of action of cysteinyl leukotrienes on glucose and lactate balance and on flow in perfused rat liver. Comparison with the effects of sympathetic nerve stimulation and noradrenaline / M. Iwai, K. Jungermann // *Eur. J. Biochem.* – 1989. – Mar. 15, Vol. 180(2). – P. 273–281.

174. Jaff, M. S. Relation between ABO blood groups and Helicobacter pylori infection in symptomatic patients / M. S. Jaff // Clin. Exper. Gastroenterol. – 2011. – Vol. 4. – P. 221–226.

175. Jain, A. N. Surflex: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine / A. N. Jain // J. Med. Chem. – 2003. – Vol. 46(4). – P. 499–511.

176. Jiang, B. Aerobic glycolysis and high Level of lactate in cancer metabolism and microenvironment / B. Jiang // Genes & Diseases. – 2017. – Feb. 14, Vol. 4(1). – P. 25–27.

177. Jin, L. Targeting protein-protein interaction by small molecules / L. Jin, W. Wang, G. Fang // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2014. – Vol. 54. – P. 435–456.

178. JMJD2A promotes the Warburg effect and nasopharyngeal carcinoma progression by transactivating LDHA expression / Y. Su, Q. H. Yu, X. Y. Wang [et al.] // BMC Cancer. – 2017. – Jul. 11, Vol. 17(1). – P. 477.

179. Jones, R. S. Monocarboxylate Transporters: Therapeutic Targets and Prognostic Factors in Disease / R. S. Jones, M. E. Morris // Clin. Pharmacol. Ther. – 2016. – Nov., Vol. 100(5). – P. 454–463.

180. Jovanovic, S. M-LDH serves as a regulatory subunit of the cytosolic substrate-channelling complex in vivo / S. Jovanovic, R. M. Crawford // J. Mol. Biol. – 2007. – Vol. 371. – P. 349–361.

181. Kelly, B. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity / B. Kelly, L. A. O'Neill // Cell Res. – 2015. – Jul., Vol. 25(7). – P. 771–784.

182. Kim, E. S. The Future of Molecular Medicine: Biomarkers, BATTLEs, and Big Data / E. S. Kim // Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book. – 2015. – Vol. 35. – P. 22–27.

183. Kim, J. W. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect / J. W. Kim, C. V. Dang // Cancer Res. – 2006. – Vol. 66. – P. 8927–8930.

184. Klevecz, R. R. Cyclic changes in enzyme activity in synchronized mammalian cell cultures / R. R. Klevecz, F. H. Ruddle // *Science*. – 1968. – Vol. 159. – P. 634–636.
185. Klevecz, R. R. Temporal order in mammalian cells. I. The periodic synthesis of lactate dehydrogenase in the cell cycle / R. R. Klevecz // *J. Cell Biol.* – 1969. – Vol. 43. – P. 207–219.
186. Kohler, G. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity / G. Kohler, C. Milstein // *Nature*. – 1975. – Vol. 256. – P. 495–497.
187. Kopperschläger, G. Methods for the separation of lactate dehydrogenases and clinical significance of the enzyme / G. Kopperschläger, J. Kirchberger // *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* – 1996. – Vol. 684(1–2). – P. 25–49.
188. Kraut, J. A. Lactic acidosis / J. A. Kraut, N. E. Madias // *N. Engl. J. Med.* – 2014. – Vol. 371. – P. 2309–2319.
189. Kriete, A. Introductory review of computational cell cycle modeling / A. Kriete, E. Noguchi, C. Sell // *Methods Mol. Biol.* – 2014. – Vol. 1170. – P. 267–275.
190. Kroemer, G. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel / G. Kroemer, J. Pouyssegur // *Cancer Cell*. – 2008. – Vol. 13. – P. 472–482.
191. Krzymień, J. Lactic acidosis in patients with diabetes / J. Krzymień, W. Karnafel // *Pol. Arch. Med. Wewn.* – 2013. – Vol. 123(3). – P. 91–97.
192. Lactate: A Metabolic Driver in the Tumour Landscape / L. Ippolito, A. Morandi, E. Giannoni, P. Chiarugi [et al.] // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2018. – Vol. 44 (2). – P. 153-166.
193. Lactate and glucose metabolism in severe sepsis and cardiogenic shock / J. P. Revelly, L. Tappy, A. Martinez [et al.] // *Crit. Care Med.* – 2005. – Vol. 33(10). – P. 2235–2240.

194. Lactate and the lactate-to-pyruvate molar ratio cannot be used as independent biomarkers for monitoring brain energetic metabolism: a microdialysis study in patients with traumatic brain injuries / J. Sahuquillo, M. A. Merino, A. Sánchez-Guerrero [et al.]. – Text : electronic // PLoS ONE. – 2014. – Jul. 15, Vol. 9(7). – e102540. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4099374/> (date of access: 17.11.2019).

195. Lactate content and pH in muscle samples obtained after dynamic exercise / K. Sahlin, R. Harris, B. Ny Lind [et al.] // Pflügers Arch. – 1976. – Vol. 367. – P. 143–149.

196. Lactate dehydrogenase 5 (LDH-5) expression in endometrial cancer relates to the activated VEGF/VEGFR2(KDR) pathway and prognosis / A. Giatromanolaki, E. Sivridis, K. C. Gatter [et al.] // Gynecol. Oncol. – 2006. – Vol. 103. – P. 912–918.

197. Lactate dehydrogenase 5 expression in Non-Hodgkin lymphoma is associated with the induced hypoxia regulated protein and poor prognosis / R. Lu, M. Jiang, Z. Chen [et al.] // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8. – P. 74853.

198. Lactate dehydrogenase 5 isoenzyme overexpression defines resistance of prostate cancer to radiotherapy / M. I. Koukourakis, A. Giatromanolaki, M. Panteliadou [et al.] // Br. J. Cancer. – 2014. – Vol. 10. – P. 2217–2223.

199. Lactate dehydrogenase A in cancer: a promising target for diagnosis and therapy / P. Miao, S. Sheng, X. Sun [et al.] // IUBMB Life. – 2013. – Vol. 65. – P. 904–910.

200. Lactate dehydrogenase A is overexpressed in pancreatic cancer and promotes the growth of pancreatic cancer cells / Y. Rong, W. Wu, X. Ni [et al.] // Tumour Biol. – 2013. – Vol. 34. – P. 1523–1530.

201. Lactate is always the end product of glycolysis / M. J. Rogatzki, B. S. Ferguson, M. L. Goodwin [et al.] // Front Neurosci. – 2015. – Feb. 27, Vol. 9. – P. 22.

202. Lactate production by the lungs in acute lung injury / D. De Backer, J. Creteur, H. Zhang [et al.] // *Am. J. Respir Crit. Care Med.* – 1997. – Vol. 156(4 Pt 1). – P. 1099–1104.

203. Lactate promotes plasticity gene expression by potentiating NMDA signaling in neurons / J. Yang, E. Ruchti, J. M. Petit [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2014. – Vol. 111(33). – P. 12228–12233.

204. Lactate reduces liver and pancreatic injury in Toll-like receptor- and inflammasome-mediated inflammation via GPR81-mediated suppression of innate immunity / R. Hoque, A. Farooq, A. Ghani [et al.] // *Gastroenterology.* – 2014. – Jun., Vol. 146(7). – P. 1763–1774.

205. Lactate Regulates Metabolic and Pro-inflammatory Circuits in Control of T Cell Migration and Effector Functions / R. Haas, J. Smith, V. Rocher-Ros [et al.] // *PLoS Biol.* – 2015. – Jul. 16, Vol. 13(7). – P. e1002202.

206. Lactate release from adipose tissue and skeletal muscle in vivo: defective insulin regulation in insulin-resistant obese women / V. Qvisth, E. Hagström-Toft, E. Moberg [et al.] // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2007. – Mar., Vol. 292(3). – P. E709–E714.

207. Lactate and its many faces / M. Taher, W. G. Leen, R. A. Wevers [et al.] // *Eur. J. Paediatr. Neurol.* – 2016. – Jan., Vol. 20(1). – P. 3–10.

208. Lactate as a signaling molecule: Journey from dead end product of glycolysis to tumor survival / D. Rawat, S. K. Chhonker, R. A. Naik [et al.] // *Front Biosci. (Landmark Ed).* – 2019. – Jan. 1, Vol. 24. – P. 366–381.

209. Lactate at the crossroads of metabolism, inflammation, and autoimmunity / V. Pucino, M. Bombardieri, C. Pitzalis [et al.] // *Eur. J. Immunol.* – 2017. – Jan., Vol. 47(1). – P. 14–21.

210. Lactate reduces glutamate-induced neurotoxicity in rat cortex / J. Ros, N. Pecinska, B. Alessandri [et al.] // *J. Neurosci Res.* – 2001. – Dec. 1, Vol. 66(5). – P. 790–794.

211. Lactate-mediated glia-neuronal signalling in the mammalian brain / F. Tang, S. Lane, A. Korsak [et al.] // *Nature Communications*. – 2014. – Vol. 5. – P. 3284.
212. Lactic acid delays the inflammatory response of human monocytes / K. Peter, M. Rehli, K. Singer [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2015. – Feb. 13, Vol. 457(3). – P. 412–418.
213. Lactic Acid: No Longer an Inert and End-Product of Glycolysis / S. Sun, H. Li, J. Chen [et al.] // *Physiology (Bethesda)*. – 2017. – Nov., Vol. 32(6). – P. 453–463.
214. Lasseter, B. F. *Biochemistry in the Lab: A Manual for Undergraduates* / B.F. Lasseter. – Boca Raton: CRC Press, 2019. – 188 p.
215. LDH-A inhibition, a therapeutic strategy for treatment of hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer / H. Xie, V. A. Valera, M. J. Merino [et al.] // *Mol. Cancer Ther.* – 2009. – Vol. 8. – P. 626–635.
216. Leigh syndrome in a girl with a novel DLD mutation causing E3 deficiency / S. C. Quinonez, S. M. Leber, D. M. Martin [et al.] // *Pediatr. Neurol.* – 2013. – Vol. 48(1). – P. 67–72.
217. Leukocyte glycolysis and lactate output in animal sepsis and ex vivo human blood / P. G. Haji-Michael, L. Ladriere, A. Sener [et al.] // *Metabolism*. – 1999. – Vol. 48(6). – P. 779–785.
218. Levine, A. J. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes / A. J. Levine, A. M. Puzio-Kuter // *Science*. – 2010. – Vol. 330. – P. 1340–1344.
219. Levy, B. Lactate and shock state: the metabolic view / B. Levy // *Curr. Opin. Crit. Care*. – 2006. – Vol. 12(4). – P. 315–321.
220. Li, X. Systematic investigation of protein-small molecule interactions / X. Li, X. Wang, M. Snyder // *IUBMB Life*. – 2013. – Vol. 65(1). – P. 2–8.
221. LigandFit: a novel method for the shape-directed rapid docking of ligands to protein active sites / C. M. Venkatachalam, X. Jiang, T. Oldfield [et al.] // *J. Mol. Graph. Model.* – 2003. – Vol. 21(4). – P. 289–307.

222. Low plasma lactate concentration as a biomarker of an incompetent brain-pull: a risk factor for weight gain in type 2 diabetes patients / R. van Dyken, C. Hubold, S. Meier [et al.] // *Psychoneuroendocrinology*. – 2010. – Oct., Vol. 35(9). – P. 1287–1293.

223. Lu, H. Hypoxia inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis / H. Lu, R. A. Forbes, A. Verma // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277(26). – P. 23111–23115.

224. Lyssiotis, C. A. Metabolic Interactions in the Tumor Microenvironment / C. A. Lyssiotis, A. C. Kimmelman // *Trends Cell. Biol.* – 2017. – Vol. 11. – P. 863–875.

225. Map of Protein-Metabolite Interactions Reveals Principles of Chemical Communication / I. Piazza, K. Kochanowski, V. Cappelletti [et al.] // *Cell*. – 2018. – Jan. 11, Vol. 172(1-2). – P. 358.e23–372.e23.

226. Markert, C. L. Evolution of a gene. Multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation / C. L. Markert, J. B. Shaklee, G. S. Whitt // *Science*. – 1975. – Vol. 189. – P. 102–114.

227. Marsh, W. L. Scoring of hemagglutination reactions / W. L. Marsh // *Transfusion*. – 1972. – Vol. 12(5). – P. 352–353.

228. McClendon, S. The approach to the Michaelis complex in lactate dehydrogenase: the substrate binding pathway / S. McClendon, N. Zhadin, R. Callender // *Biophys. J.* – 2005. – Vol. 89. – P. 2024–2032.

229. McFedries, A. Methods for the Elucidation of Protein-Small Molecule Interactions / A. McFedries, A. Schwaid, A. Saghatelian // *Chemistry & Biology*. – 2013. – Vol. 20(5). – P. 667–673.

230. Metabolic plasticity underpins innate and acquired resistance to LDHA inhibition / A. Boudreau, H. E. Purkey, A. Hitz [et al.] // *Nat. Chem. Biol.* – 2016. – Vol. 12. – P. 779–786.

231. Metabolic symbiosis enables adaptive resistance to anti-angiogenic therapy that is dependent on mTOR signaling / E. Allen, P. Mieville, C. M. Warren [et al.] // *Cell Rep.* – 2016. – May 10, Vol. 15(6). – P. 1144–1160.

232. Metabonomics Analysis of Plasma Reveals the Lactate to Cholesterol Ratio as an Independent Prognostic Factor of Short-Term Mortality in Acute Heart Failure / F. Desmoulin, M. Galinier, C. Trouillet [et al.] // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8(4). – P. e60737.

233. Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions / S. A. Seidel, P. M. Dijkman, W. A. Lea [et al.] // *Methods.* – 2013. – Mar., Vol. 59(3). – P. 301–315.

234. MicroScale thermophoresis: interaction analysis and beyond / M. Jerabek-Willemsen, R. Andre, T. Wannera [et al.] // *J. Mol. Struct.* – 2014. – Vol. 1077. – P. 101–113.

235. Mild hyperlactatemia in stable septic patients is due to impaired lactate clearance rather than overproduction / J. Levraut, J. P. Ciebiera, S. Chave [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1998. – Vol. 157(4 Pt 1). – P. 1021–1026.

236. Mild phenotype in a male with pyruvate dehydrogenase complex deficiency associated with novel hemizygous in-frame duplication of the E1alpha subunit gene (PDHA1) / J. Steller, J. J. Gargus, L. H. Gibbs [et al.] // *Neuropediatrics.* – 2014. – Vol. 45(1). – P. 56–60.

237. Miles, M. F. Cyclic AMP regulation of lactate dehydrogenase. Quantitation of lactate dehydrogenase M-subunit messenger RNA in isoproterenol- and N6,O2'-dibutyryl cyclic AMP-stimulated rat C6 glioma cells by hybridization analysis using a cloned cDNA probe / M. F. Miles, P. Hung, R. A. Jungmann // *J. Biol. Chem.* – 1981. – Vol. 256. – P. 12545–12552.

238. Mishra, D. Lactate Dehydrogenases as Metabolic Links between Tumor and Stroma in the Tumor Microenvironment / D. Mishra, D. Banerjee // *Cancers (Basel).* – 2019. – Vol. 11(6). – P. 750.

239. Mitra, R. Blood groups systems. Indian / R. Mitra, N. Mishra, G. P. Rath // *Journal of Anaesthesia.* – 2014. – Vol. 58(5). – P. 524–528.

240. Mizock, B. A. Hyperlactatemia in acute liver failure: decreased clearance versus increased production / B. A. Mizock // *Crit. Care Med.* – 2001. – Vol. 9(11). – P. 2225–2226.

241. Molecular analysis of abnormal pyruvate dehydrogenase in a patient with thiamine-responsive congenital lactic acidemia / E. Naito, M. Ito, E. Takeda [et al.] // *Pediatr. Res.* – 1994. – Vol. 36(3). – P. 340–346.

242. *Molecular Biology of the Gene* / J. D. Watson, T. A. Baker, S. P. Bell [et al.]. – San Francisco, CA : Benjamin Cummings, 2004. – 912 p.

243. *Molecular Computing and Bioinformatics* / X. Liang, W. Zhu, Z. Lv [et al.]. – Text : electronic // *Molecules.* – 2019. – Jun. 26, Vol. 24(13). – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6651761> (date of access: 17.11.2019).

244. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 3. A(X) and B(A) alleles / F. Yamamoto, P. D. McNeill, M. Yamamoto [et al.] // *Vox Sang.* – 1993. – Vol. 64(3). – P. 171–174.

245. MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities / C. V. Dang [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2009. – Vol. 15. – P. 6479–6483.

246. Nasi, A. Disarmed by density: A glycolytic break for immunostimulatory dendritic cells? / A. Nasi, B. Rethi // *Oncoimmunology.* – 2013. – Dec. 1, Vol. 2(12). – P. e26744.

247. Natural selection of mitochondria during somatic lifetime promotes healthy aging / A. Rodell, L. J. Rasmussen, L. H. Bergersen [et al.] // *Front Neuroenergetics.* – 2013. – Aug. 12, Vol. 5. – P. 7.

248. Neuronal basis of age-related working memory decline / M. Wang, N. J. Gamo, Y. Yang [et al.] // *Nature.* – 2011. – Jul. 27, Vol. 476(7359). – P. 210–203.

249. Nonnative glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase can be an intrinsic component of amyloid structures / I. Naletova, E. Schmalhausen, A. Kharitonov [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – Vol. 1784. – P. 2052–2058.

250. Novel compound heterozygous mutations in the fructose-1,6-bisphosphatase gene cause hypoglycemia and lactic acidosis / S. Moon, J. H. Kim, J. H. Han [et al.] // *Metabolism*. – 2011. – Vol. 60(1). – P. 107–113.

251. Novel microscale approaches for easy, rapid determination of protein stability in academic and commercial settings / C. G. Alexander, R. Wanner, C. M. Johnson [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2014. – Vol. 1844(12). – P. 2241–2250.

252. Overexpression of the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in skeletal muscle repatterns energy metabolism in the mouse / P. Hakimi, J. Yang, G. Casadesus [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Nov. 9, Vol. 282(45). – P. 32844–32855.

253. Oxaloacetate activates brain mitochondrial biogenesis, enhances the insulin pathway, reduces inflammation and stimulates neurogenesis / H. M. Wilkins, J. L. Harris, S. M. Carl [et al.] // *Hum Mol. Genet.* – 2014. – Dec. 15, Vol. 23(24). – P. 6528–6541.

254. Pan, L. Lactate dehydrogenase (LDH) isoenzymes and proliferative activity of lymphoid cells—an immunocytochemical study / L. Pan, P. C. Beverley, P. G. Isaacson // *Clin. Exp. Immunol.* – 1991. – Vol. 86. – P. 240–245.

255. Pavlova, N. N. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism / N. N. Pavlova, C. B. Thompson // *Cell. Metab.* – 2016. – Vol. 1. – P. 27–47.

256. Pecqueur, C. Targeting metabolism to induce cell death in cancer cells and cancer stem cells / C. Pecqueur, L. Oliver, K. Oizel [et al.]. – Text : electronic // *Int. J. Cell. Biol.* – 2013. – p. 805975. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3583110/> (date of access: 17.11.2019).

257. Phage Display-based Strategies for Cloning and Optimization of Monoclonal Antibodies Directed against Human Pathogens / N. Clementi, N. Mancini, L. Solfrosi [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2012. – Vol. 13(7). – P. 8273–8292.

258. Pierre, K. MCT2 is a major neuronal monocarboxylate transporter in the adult mouse brain / K. Pierre, P. J. Magistretti, L. Pellerin // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2002. – May, Vol. 22(5). – P. 586–595.

259. Pineda, J. R. Ligand binding and protein dynamics in lactate dehydrogenase / J. R. Pineda, R. Callender, S. D. Schwartz // *Biophys. J.* – 2007. – Sep. 1, Vol. 93(5). – P. 1474–1483.

260. Pirhadi, S. Open Source Molecular Modeling / S. Pirhadi, J. Sunseri, D. R. Koes // *Journal of Molecular Graphics & Modelling.* – 2016. – Vol. 69. – P. 127–143.

261. Robustness of biological activity spectra predicting by computer program PASS for noncongeneric sets of chemical compounds / V.V. Poroikov, D.A. Filimonov, Y.V. Borodina [et al.] // *A. J. Chem. Inf. Comput. Sci.* – 2000. – Vol. 40. – P. 1349-1355.

262. Prognostic and predictive role of lactate dehydrogenase 5 expression in colorectal cancer patients treated with PTK787/ZK 222584 (vatalanib) antiangiogenic therapy / M. I. Koukourakis, A. Giatromanolaki, E. Sivridis [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2011. – Vol. 17. – P. 4892–4900.

263. Programmed mitophagy is essential for the glycolytic switch during cell differentiation / L. Esteban-Martínez [et al.] // *EMBO J.* – 2017. – Vol. 36. – P. 1688–1706.

264. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis / C. J. Wienken, P. Baaske, U. Rothbauer [et al.] // *Nat. Commun.* – 2010. – Oct. 19, Vol. 1. – P. 100.

265. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis / C.J. Wienken, P. Baaske, U. Rothbauer [et al.] // *Nat. Commun.* – 2010. – Vol. 1. – P. 100.

266. Proteomic characterization of early lung response to breast cancer metastasis in mice / A. Kurpińska, J. Suraj, E. Bonar [et al.] // *Exp. Mol. Pathol.* – 2019. – Apr., Vol. 107. – P. 129–140.

267. Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1 / W. Luo, H. Hu, R. Chang [et al.] // *Cell*. – 2011. – Vol. 145. – P. 732–744.

268. Rab2 utilizes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and protein kinase C α to associate with microtubules and to recruit dynein / E. J. Tisdale, F. Azizi, C. R. Artalejo // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284. – P. 5876–5884.

269. Rani, R. Recent Update on Human Lactate Dehydrogenase Enzyme 5 (hLDH5) Inhibitors: A Promising Approach for Cancer Chemotherapy / R. Rani, V. Kumar // *J. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 59. – P. 487–496.

270. Recent Developments of the Chemistry Development Kit (CDK) - An Open-Source Java Library for Chemo- and Bioinformatics / C. Steinbeck, C. Hoppe, S. Kuhn [et al.] // *Curr. Pharm. Des.* – 2006. – Vol. 12(17). – P. 2111–2120.

271. Relating protein pharmacology by ligand chemistry / M. J. Keiser, B. L. Roth, B. N. Armbruster [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 25. – P. 197–206.

272. Research on blood distribution of Tibetan population in Ali area. [Article in Chinese; Abstract available in Chinese from the publisher] / X. X. Liu, D. D. Li, H. L. Li [et al.] // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. – 2017. – Dec. 12, Vol. 97(46). – P. 3628–3631.

273. Reszec, J. The expression of hypoxia-inducible factor-1 in primary brain tumors / J. Reszec, R. Rutkowski, L. Chyczewski // *Int. J. Neurosci.* – 2013. – Vol. 123. – P. 657–662.

274. Reverberi, R. Factors affecting the antigen-antibody reaction / R. Reverberi, L. Reverberi // *Blood Transfusion*. – 2007. – Vol. 5(4). – P. 227–240.

275. Review of Drug Repositioning Approaches and Resources / H. Xue, J. Li, H. Xie [et al.] // *Int. J. Biol. Sci.* – 2018. – Jul. 13, Vol. 14(10). – P. 1232–1244.

276. Role of natural antibodies in immune homeostasis: IVIg perspective / J. Vani, S. Elluru, V. S. Negi [et al.] // *Autoimmun. Rev.* – 2008. – Vol. 7(6). – P. 440–444.

277. Roles of acidextruding ion transporters in regulation of breast cancer cell growth in a 3-dimensional microenvironment / A. P. Andersen, M. Flinck, E. K. Oernbo [et al.] // *Molecular cancer*. – 2016. – Vol. 15(1). – P. 45.

278. Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis – the seventh hallmark of cancer / S. J. Yeung [et al.] // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2008. – Vol. 65. – P. 3981–3999.

279. Rosenstein, P.G. Clinical use of plasma lactate concentration. Part 1: Physiology, pathophysiology, and measurement / P.G. Rosenstein, B.S. Tennent-Brown, D. Hughes // *J Vet Emerg Crit Care*. – 2018. – Vol. 28 (2). – P. 85-105.

280. Ruddigkeit, L. Visualization and virtual screening of the chemical universe database GDB-17 / L. Ruddigkei, L. C. Blum, J. L. Reymond // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2013. – Vol. 53(1). – P. 56–65.

281. Ruiz, J. P. Type B actic acidosis Secondary to malinancy: Case report, review of published cases, insights into pathogenesis, and prospects for therapy / J. P. Ruiz, A. K. Singh, P. Hart // *Scientific World Journal*. – 2011. – Vol. 11. – P. 1316–1324.

282. Rummel, S. K. The role of the histoblood ABO group in cancer / S. K. Rummel, R. E. Ellsworth. – Text : electronic // *Future Sci. OA*. – 2016. – Mar. 15, Vol. 2(2). – P. FSO107. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC513799> (date of access: 17.11.2019).

283. San-Millan, I. Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect / I. San-Millan, G.A. Brooks // *Carcinogenesis*. – 2017. – Vol. 38(2). – P. 119-133.

284. Screening of novel inhibitors targeting lactate dehydrogenase A via four molecular docking strategies and dynamics simulations / R. Sun, X. Li, Y. Li [et al.] // *J. Mol. Model*. – 2015. – Vol. 21. – P. 133.

285. Semenza, G. L. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism / G. L. Semenza // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2010. – Vol. 20. – P. 51–56.

286. Senisterra, G. Thermal denaturation assays in chemical biology / G. Senisterra, I. Chau, M. Vedadi // *Assay Drug Dev Technol.* – 2012. – Vol. 10. – P. 128–136.

287. Serum lactic dehydrogenase strongly predicts survival in metastatic nasopharyngeal carcinoma treated with palliative chemotherapy / X. Ye, L. Shao, B. C. Lin [et al.] // *Eur. J. Cancer.* – 2013. – Vol. 49. – P. 1619–1626.

288. Serum S100B, lactate dehydrogenase and brain metastasis are prognostic factors in patients with distant melanoma metastasis and systemic therapy / B. Weide, S. Richter, P. Büttner [et al.] // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8. – P. 81624.

289. Shi, Y. Human lactate dehydrogenase a inhibitor: A molecular dynamics investigation / Y. Shi, B. M. Pinto // *PLoS ONE.* – 2014. – Vol. 9. – P. e86365.

290. Sica, D. A. Loop diuretic therapy, thiamine balance, and heart failure / D. A. Sica // *Congest. Heart Fail.* – 2007. – Vol. 13. – P. 244–247.

291. Sieburg, H. B. The cellular device machine point of departure for large-scale simulations of complex biological systems / H. B. Sieburg // *Computers Math. Applic.* – 1990. – Vol. 20. – P. 247–267.

292. Siess, E. A. Concentration of free oxaloacetate in the mitochondrial compartment of isolated liver cells / E. A. Siess, R. I. Kientsch-Engel, O. H. Wieland // *Biochem. J.* – 1984. – Vol. 218(1). – P. 171–176.

293. Simeonov, A. Recent Developments in the Use of Differential Scanning Fluorometry in Protein and Small Molecule Discovery and Characterization / A. Simeonov // *Expert Opin. Drug Discov.* – 2013. – Sept., Vol. 8(9). – P. 1071–1082.

294. Similarity metrics for ligands reflecting the similarity of the target proteins / A. Schuffenhauer, P. Floersheim, P. Acklin [et al.] // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* – 2003. – Mar.-Apr., Vol. 43(2). – P. 391–405.

295. Site-directed mutagenesis reveals role of mobile arginine residue in lactate dehydrogenase catalysis / A. Clarke, D. Wigley, W. Chia [et al.] // *Nature.* – 1986. – Vol. 324. – P. 699–702.

296. Size does matter! Label-free detection of small molecule–protein interaction / Peter Fechner, Oliver Bleher, Melanie Ewald [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2014. – Vol. 406(17). – P. 4033–4051.

297. Some *Lactobacillus* L-lactate dehydrogenases exhibit comparable catalytic activities for pyruvate and oxaloacetate / K. Arai, T. Kamata, H. Uchikoba [et al.] // *Journal of bacteriology.* – 2001. – Vol. 183(1). – P. 397–400.

298. Sperm-Specific Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase - An Evolutionary Acquisition of Mammals / V. I. Muronetz, M. L. Kuravsky, K. V. Barinova [et al.] // *Biochemistry (Mosc).* – 2015. – Dec., Vol. 80(13). – P. 1672–1689.

299. Splanchnic and leg substrate exchange after ingestion of a natural mixed meal in humans / B. Capaldo, A. Gastaldelli, S. Antonello [et al.] // *Diabetes.* – 1999. – May, Vol. 48(5). – P. 958–966.

300. Sproule, D. M. Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: basic concepts, clinical phenotype, and therapeutic management of MELAS syndrome / D. M. Sproule, P. Kaufmann // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – Vol. 1142. – P. 133–158.

301. STITCH 2: an interaction network database for small molecules and proteins / M. Kuhn, D. Szklarczyk, A. Franceschini [et al.] // *Nucleic Acids Research.* – 2010. – Vol. 38(Database issue). – P. D552–D556.

302. STITCH 4: Integration of protein-chemical interactions with user data / M. Kuhn, D. Szklarczyk, S. Pletscher-Frankild [et al.] // *Nucleic Acids Research.* – 2014. – Vol. 42(1). – P. 401–407.

303. STITCH 5: augmenting protein-chemical interaction networks with tissue and affinity data / D. Szklarczyk, A. Santos, C. von Mering [et al.] // *Nucleic Acids Research.* – 2016. – Jan. 4, Vol. 44(D1). – P. D380–D384.

304. STITCH: interaction networks of chemicals and proteins / M. Kuhn, C. von Mering, M. Campillos [et al.] // *Nucleic Acids Research.* – 2008. – Vol. 36(Database issue). – P. D684–D688.

305. Structural basis for altered activity of M- and H-isozyme forms of human lactate dehydrogenase / J. A. Read, V. J. Winter, C. M. Eszes [et al.] // *Proteins*. – 2001. – Vol. 43. – P. 175–185.

306. Studies on the DIDS-binding site of monocarboxylate transporter 1 suggest a homology model of the open conformation and a plausible translocation cycle / M. C. Wilson, D. Meredith, C. Bunnun [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Jul. 24. – Vol. 284(30). – P. 20011–20021.

307. Study of GPR81, the lactate receptor, from distant species identifies residues and motifs critical for GPR81 functions / C. Kuei, J. Yu, J. Zhu [et al.] // *Mol. Pharmacol.* – 2011. – Nov., Vol. 80(5). – P. 848–858.

308. Su, T. Y. Lactate study using umbilical cord blood: Agreement between Lactate Pro hand-held devices with blood gas analyser and evaluation of lactate stability over time / T. Y. Su, M. Reece, S. C. Chua // *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*. – 2013. – Aug., Vol. 53(4). – P. 375–380.

309. Succinyl-CoA ligase deficiency: a mitochondrial hepatoencephalomyopathy / J. L. Van Hove, M. S. Saenz, J. A. Thomas [et al.] // *Pediatr. Res.* – 2010. – Vol. 68(2). – P. 159–160.

310. Swerdlow, Russell H. Bioenergetic medicine / Russell H. Swerdlow // *British Journal of Pharmacology*. – 2014. – Apr., Vol. 171(8). – P. 1854–1869.

311. Swierczynski, J. Role of abnormal lipid metabolism in development, progression, diagnosis and therapy of pancreatic cancer / J. Swierczynski, A. Hebanowska, T. Sledzinski // *World J. Gastroenterol.* – 2014. – Vol. 20. – P. 2279–3035.

312. Synthesis, cellular evaluation, and mechanism of action of piperlongumine analogs / D. J. Adams, M. Dai, G. Pellegrino [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2012. – Sep. 18, Vol. 109(38). – P. 15115–15120.

313. Tamar, Schlick *Molecular Modeling and Simulation: An interdisciplinary guide* / Tamar Schlick. – Springer Science and Business Media, 2010. – Aug. 3. – 723 p.

314. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice / P. Sonveaux [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2008. – Vol. 118. – P. 3930–3942.

315. Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis / P. Sonveaux, T. Copetti, C. J. De Saedeleer [et al.] // *PloS one.* – 2012. – Vol. 7(3). – P. e33418.

316. The BioGRID interaction database: 2017 update / A. Chatr-aryamontri, R. Oughtred, L. Boucher [et al.] // *Nucleic Acids Research.* – 2017. – Jan. 4, Vol. 45(Database issue). – P. D369–D379.

317. The difference in lactate dehydrogenase activity between pre- and post-mobilization periods is a good indicator of successful stem cell mobilization / A. Donmez, C. Kabaroglu, N. Gokmen [et al.] // *Transfus. Apher. Sci.* – 2013. – Feb., Vol. 48(1). – P. 83–86.

318. The first demonstration of lactic acid in human blood in shock by Johann Joseph Scherer (1814–1869) in January 1843 / E. J. Kompanje, T. C. Jansen, B. van der Hoven [et al.] // *Intensive Care Med.* – 2007. – Vol. 33(11). – P. 1967–1971.

319. The history of monoclonal antibody development – Progress, remaining challenges and future innovations / J. K. H. Liu // *Annals of Medicine and Surgery.* – 2014. – Vol. 3(4). – P. 113–116.

320. The merck index - an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals / ed. M. J. O'Neil. – Cambridge, UK : Royal Society of Chemistry, 2013. – 990 p.

321. The Regulation and Function of Lactate Dehydrogenase A: Therapeutic Potential in Brain Tumor / C. J. Valvona, H. L. Fillmore, P. B. Nunn [et al.] // *Brain Pathol.* – 2016. – Vol. 26(1). – P. 3–17.

322. The role of low-level lactate production in airway inflammation in asthma / M. Ostroukhova, N. Goplen, M. Z. Karim [et al.] // *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology.* – 2012. – Vol. 302(3). – P. L300-L307.

323. The self-inhibitory nature of metabolic networks and its alleviation through compartmentalization / M. T. Alam, V. Olin-Sandoval, A. Stincone [et al.] // *Nat. Commun.* – 2017. – Jul. 10, Vol. 8. – P. 16018.

324. The spectrum of pyruvate dehydrogenase complex deficiency: clinical, biochemical and genetic features in 371 patients / K. P. Patel, T. W. O'Brien, S. H. Subramony [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2012. – Vol. 106(3). – P. 385–394.

325. The value of blood lactate kinetics in critically ill patients: a systematic review / J. L. Vincent, Amanda Quinteiros E. Silva A., L. Jr. Couto [et al.] // *Critical Care.* – 2016. – Aug. 13, Vol. 20(1). – P. 257.

326. Towards improved prognostic scores predicting survival in patients with brain metastases: a pilot study of serum lactate dehydrogenase levels / C. Nieder, K. Marienhagen, A. Dalhaug [et al.]. – Text : electronic // *Scientific World Journal.* – 2012. – 609323. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3345873/> (date of access: 17.11.2019).

327. Trifunctional lipid probes for comprehensive studies of single lipid species in living cells / D. Hoglinger, A. Nadler, P. Haberkant [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2017. – Vol. 114. – P. 1566–1571.

328. Tsujibo, H. Nucleotide sequences of the cDNA and an intronless pseudogene for human lactate dehydrogenase-A isozyme / H. Tsujibo, H. F. Tiano, S. S. Li // *Eur. J. Biochem.* – 1985. – Vol. 147. – P. 9–15.

329. Tumor-derived lactate modifies antitumor immune response: effect on myeloid-derived suppressor cells and NK cells / Z. Husain, Y. Huang, P. Seth [et al.] // *J. Immunol.* – 2013. – Aug. 1, Vol. 191(3). – P. 1486–1495.

330. Upregulation of lactate dehydrogenase A by ErbB2 through heat shock factor 1 promotes breast cancer cell glycolysis and growth / Y. H. Zhao, M. Zhou, H. Liu [et al.] // *Oncogene.* – 2009. – Vol. 28. – P. 3689–3701.

331. Urbańska, K. Unappreciated Role of LDHA and LDHB to Control Apoptosis and Autophagy in Tumor Cells / K. Urbańska, A. Orzechowski // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20(9). – P. 2085.

332. Uribarri, J. D-lactic acidosis. A review of clinical presentation, biochemical features, and pathophysiologic mechanisms / J. Uribarri, M. S. Oh, H. J. Carroll // *Medicine (Baltimore)*. – 1998. – Vol. 77(2). – P. 73–82.

333. Using two-site binding models to analyze microscale thermophoresis data / S. C. Tso, Q. Chen, S. A. Vishnivetskiy [et al.] // *Anal. Biochem.* – 2018. – Jan. 1. – P. 64–75.

334. Vander Heiden, M. G. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation / M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, C. B. Thompson // *Science*. – 2009. – Vol. 324. – P. 1029–1033.

335. Vary, T. C. Sepsis-induced alterations in pyruvate dehydrogenase complex activity in rat skeletal muscle: effects on plasma lactate / T. C. Vary // *Shock*. – 1996. – Vol. 6(2). – P. 89–94.

336. Volker, K. W. Glycolytic enzymes and assembly of microtubule networks / K. W. Volker, C. A. Reinitz, H. R. Knull // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* – 1995. – Nov., Vol. 112(3). – P. 503–514.

337. Walenta, S. Lactate: mirror and motor of tumor malignancy / S. Walenta, W. F. Mueller-Klieser // *Semin. Radiat. Oncol.* – 2004. – Vol. 14. – P. 267–274.

338. Warburg, O. On respiratory impairment in cancer cells / O. Warburg // *Science*. – 1956. – Vol. 124. – P. 269–270.

339. Weisberg, L. S. Lactic Acidosis in a Patient with Type 2 Diabetes Mellitus / L. S. Weisberg // *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. – 2015. – Vol. 10(8). – P. 1476–1483.

340. Woods, H. F. Clinical and biochemical aspects of lactic acidosis / H. F. Woods, R. Cohen. – Oxford : Blackwell Scientific, 1976. – 276 p.

341. Zhang, H. ABO blood groups and cardiovascular diseases / H. Zhang, C. J. Mooney, M. P. Reilly. – Text : electronic // *Int. J. Vasc. Med.* – 2012. – 641917. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3485501/> (date of access: 17.11.2019).

342. Zhao, Y. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics / Y. Zhao, E. B. Butler, M. Tan // *Cell. Death Dis.* – 2013. – Vol. 4. – P. 532.

ПРИЛОЖЕНИЯ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации программы для ЭВМ

№ 2016611308

Регистрация и учет расходных материалов, анализ количества и качества проведенных исследований в отделе ПЦР-диагностики иммунологической лаборатории

Правообладатель: *Мельник Кристина Николаевна (RU)*

Авторы: *Мельник Кристина Николаевна (RU), Баишева Гульнара Максимовна (RU), Алпатовая Татьяна Алексеевна (RU), Шадрина Лариса Викторовна (RU), Кучеров Данила Игоревич (RU), Горбачева Ирина Васильевна (RU), Потехина Валерия Игоревна (RU), Гуркова Елена Анатольевна (RU), Гильмиярова Фрида Насыровна (RU)*

Заявка № 2015661961

Дата поступления 08 декабря 2015 г.

Дата государственной регистрации

в Реестре программ для ЭВМ 29 января 2016 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев Г.П. Ивлиев

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2680408

**СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ ВЛИЯНИЯ
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА АФФИНИТЕТ БЕЛОК-
ЛИГАНДНОЙ СВЯЗИ**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
"Самарский государственный медицинский университет"
Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2018109670

Приоритет изобретения 19 марта 2018 г.

Дата государственной регистрации в


Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 21 февраля 2019 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 19 марта 2038 г.

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

 Г.П. Ивлиев



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2698628

**СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ ВЛИЯНИЯ
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА КОНФОРМАЦИЮ БЕЛКА**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
"Самарский государственный медицинский университет"
Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2019118363

Приоритет изобретения 13 июня 2019 г.

Дата государственной регистрации в
Государственном реестре изобретений
Российской Федерации 28 августа 2019 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 13 июня 2039 г.

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

 Г.П. Ивлиев



«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по учебной работе
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава РФ
доктор фармацевтических наук,
профессор


Е.В. Авдеева

« 9 » января 2020 г.

АКТ

об использовании предложения

Автор внедрения (авторы): Кузьмичева Валерия Игоревна.

Источник предложения: фрагмент кандидатской диссертации Кузьмичевой Валерии Игоревны «Структурно-функциональный потенциал лактата в регуляции межмолекулярных взаимодействий».


Объект внедрения (методика, способ и др.): экспериментальная модель для изучения влияния эндогенных биорегуляторов на фермент-субстратное взаимодействие, конформационную лабильность каталитических белков.

Использовано: в лекционных курсах и на практических занятиях кафедры биохимии

с « 9 » января 2020 г.

Заключение: расширяет знания о спектре биологической активности, регуляторных возможностях лактата и оксалоацетата.

Зав. кафедрой фундаментальной
и клинической биохимии
с лабораторной диагностикой
ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава РФ
Доктор медицинских наук, доцент



О.А.Гусякова

«УТВЕРЖДАЮ»

Главный врач Клиник СамГМУ —
проректор по клинической работе
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава РФ
доктор медицинских наук, профессор
А.Г. Сонис



10 января 2020 г.

**АКТ
об использовании предложения**

Автор внедрения (авторы): Кузьмичева Валерия Игоревна.

Источник предложения: фрагмент кандидатской диссертации Кузьмичевой Валерии Игоревны «Структурно-функциональный потенциал лактата в регуляции межмолекулярных взаимодействий».

Объект внедрения (методика, способ и др.): экспериментальная модель исследования влияния веществ эндогенного происхождения, обладающих биологической и фармакологической активностью, на процессы белок - белкового, в частности, антиген - антительного взаимодействия.

Использовано: в работе клинко-диагностической лаборатории

с « 10 » января 2020 г.

Заключение: аргументирована необходимость учета влияния изменений в фонде метаболитов в крови, в частности, гиперлактатемии, при патологических процессах на результаты высокотехнологичных методов исследования (иммуноферментный, электрохемилюминесцентный анализ)

Зав. клинко-диагностической лаборатории
Клиник ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава РФ,
доктор медицинских наук, доцент

О.А. Гуськова

«УТВЕРЖДАЮ»

Главный врач
ГБУЗ СОКБ им. В.Д. Середавина
доктор медицинских наук, доцент
А.С. Бенья



2020 г.

**АКТ
об использовании предложения**

Автор внедрения (авторы): Кузьмичева Валерия Игоревна.

Источник предложения: фрагмент кандидатской диссертации Кузьмичевой Валерии Игоревны «Структурно-функциональный потенциал лактата в регуляции межмолекулярных взаимодействий».

Объект внедрения (методика, способ и др.): экспериментальная модель исследования влияния веществ эндогенного происхождения, обладающих биологической и фармакологической активностью, на процессы фермент-субстратного взаимодействия.

Использовано: в работе клинико-диагностической лаборатории

с «13» января 2020 г.

Заключение: аргументирована необходимость учета влияния изменений в фонде метаболитов в крови, в частности, оксалоацетата, при патологических процессах на результаты биохимического анализа.

Заведующая отделением
лабораторной диагностики
ГБУЗ СОКБ им. В.Д. Середавина

Е.Е. Потякина

«УТВЕРЖДАЮ»

Главный врач
ГБУЗ СО ДКБ им. Н.Н. Ивановой

Селезнева О.О. Балахова

«13» января



АКТ

об использовании предложения

Автор внедрения (авторы): Кузьмичева Валерия Игоревна.

Источник предложения: фрагмент кандидатской диссертации Кузьмичевой Валерии Игоревны «Структурно-функциональный потенциал лактата в регуляции межмолекулярных взаимодействий».

Объект внедрения (методика, способ и др.): экспериментальный метод оценки содержания веществ эндогенного происхождения, обладающих биологической и фармакологической активностью в зависимости от антигенного профиля эритроцитов.

Использовано: в работе клиничко-диагностической лаборатории

с «13» января 2020 г.

Заключение: аргументирована необходимость учета биологической вариабельности, обусловленной групповой принадлежностью крови по системе АВ0, на содержание метаболитов (лактат, пируват) при проведении биохимического анализа крови при различных патологических процессах.

Зав. клиничко-диагностической лаборатории
ГБУЗ СО ДКБ им. Н.Н. Ивановой

Е.А. Милохова