

На правах рукописи

РЫСКИНА ЕЛЕНА АНАТОЛЬЕВНА

**ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
МЕТАБОЛИТОВ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ С ЛИГАНДАМИ**

03.01.04 – Биохимия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва 2017

Работа выполнена в ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»
и ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет».

Научные консультанты: **Чернов Николай Николаевич**,
доктор биологических наук, профессор,
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»,
кафедра биохимии имени академика Т.Т. Березова, профессор
Гильмиярова Фрида Насыровна,
заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук,
профессор, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский
университет», кафедра фундаментальной
и клинической биохимии с лабораторной диагностикой, профессор

Официальные оппоненты: **Муронец Владимир Израилевич**,
доктор биологических наук, профессор
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В.
Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-
химической биологии им. А.Н. Белозерского, отдел биохимии
животной клетки, заведующий отделом
Яровая Галина Алексеевна,
доктор биологических наук, профессор,
заслуженный работник высшей школы РФ,
ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия
непрерывного профессионального образования»,
медико-биологический факультет, декан
Быков Илья Михайлович,
доктор медицинских наук, профессор
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский
университет», кафедра фундаментальной и клинической биохимии,
заведующий кафедрой

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «24» мая 2017 г. в 15 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 212.203.39 при Российском университете дружбы народов по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6 и на сайте dissovet.rudn.ru

Автореферат разослан « » апреля 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

О.Б. Гигани

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Характерной чертой биомедицинских исследований начала постгеномной эры стало возникновение и развитие ряда новых научных дисциплин – геномики, транскриптомики, протеомики и метаболомики, использующих в исследованиях системный подход и комплекс современных технологий. Новые научные дисциплины стали важнейшими источниками новых знаний о генах, транскриптомах, белках и метаболитах человека, которые необходимы для развития фундаментальной биологии и медицины, поскольку на основе этих знаний формируются и детализируются представления о молекулярных основах биологических процессов в норме и патологии, а также расширяются диагностические возможности современной медицины. Независимо от того, каким образом получены данные, они будут обрабатываться, и интерпретироваться с помощью методов биоинформатики, играющей роль цементирующего начала. Одним из методов биоинформатики является компьютерное моделирование. Компьютерное моделирование белковых структур и межмолекулярных взаимодействий стало неотъемлемой частью многих областей исследования в биомедицине, так как оно позволяет сформировать математически обоснованные предположения о структуре и биологической активности участников биохимических процессов в организме человека.

В настоящее время установлено, что межмолекулярные взаимодействия играют важнейшую роль в реализации жизненно важных функций в клетке, в органе и в организме в целом. Решающими практически во всех основных биологических процессах, таких как: клеточная регуляция, биосинтез и биодegradация, передача сигнала, процессы транскрипции и трансляции, образование олигомеров и мультимолекулярных комплексов, упаковка вирусов и иммунный ответ, являются белок-лигандные взаимодействия (Чернов Н.Н., 1996; Терентьев А.А. и соавт., 2009; Kastritis P.L. et al., 2012; Gylmiyarova F.N et al., 2014). Полифункциональность белков обусловлена их способностью изменять конформацию молекулы при взаимодействии с лигандами. Белки могут взаимодействовать практически со всеми типами молекул: от небольших соединений – вода, ионы металлов, углеводы, жирные кислоты, фосфолипиды клеточных мембран – до высокомолекулярных белков и нуклеиновых кислот (Chebotareva N.A. et al., 2015; Du X. et al., 2016). Нарушение взаимодействий между белками лежит в основе некоторых заболеваний (Muronetz V.I. et al., 2016).

Вследствие революционного прогресса в изучении протеомики в настоящее время сложилось более точное представление о количестве белков, синтезируемых в организме, но явно недостаточны знания о лигандах, с которыми белки могут взаимодействовать. Эндогенные метаболиты составляют большинство молекул в клетке, а многочисленные взаимодействия белок–метаболит являются самыми распространенными (Clements M. et al., 2011). Метаболиты могут выступать не только в качестве субстратов и продуктов ферментативных реакций, но и служить регуляторами сигнальных путей и модуляторами функций как отдельных молекул, так и биохимических каскадов (Cantelmo A.R. et al., 2015). Малые и средние

молекулы метаболитов действуют быстро и связываются обратимо, что позволяет эффективно изменять функции белков (Castoreno A.V. et al., 2011).

Актуальность изучения регуляции белок-лигандных взаимодействий обусловлена появлением новых взглядов на роль метаболитов и их ключевым значением в процессах жизнедеятельности.

На сегодняшний день имеющиеся в арсенале науки методы исследования позволяют получить информацию о состоянии базовых метаболических путей в организме. Однако практически отсутствует система данных для выявления индивидуальных молекулярных основ метаболизма, факторах эндогенной природы, определяющих физиологический уровень обмена и особенность индивидуальной реакции. Важная роль в специфической защите организма, энергетическом, метаболическом обеспечении принадлежит крови и прежде всего эритроцитам, участвующим в поддержании динамического гомеостаза организма (Гильмиярова Ф.Н. и соавт., 2007). Примером структурного и функционального полиморфизма у человека служат антигены эритроцитов системы групп крови АВ0. Систему группы крови АВ0 составляют два групповых антигена – А и В и два соответствующих антитела в плазме – анти-А и анти-В. Различные сочетания этих антигенов и антител образуют четыре группы крови. Создание теоретической и экспериментальной базы данных о функциональной специфике антигенов системы АВ0 может стать основой для выяснения причин индивидуальной реакции на экзогенные и эндогенные факторы обладателей различных групп крови, что будет содействовать дальнейшему развитию персонализированной медицины.

Таким образом, представляется актуальным изучение особенностей влияния низкомолекулярных соединений, участвующих в метаболических процессах, таких как пируват, лактат и этанол, на белок-лигандные взаимодействия, что позволит найти новые пути к выяснению механизмов различных превращений, включая иммунологические, в основе которых лежат процессы межмолекулярного узнавания.

Степень научной разработанности темы исследования. Белок-лигандные взаимодействия управляют множеством сигнальных путей в клетке, которые регулируют гомеостаз и отвечают на внешние и внутренние раздражители. В классическом понимании биохимии многие белок-лигандные взаимодействия рассматриваются как реакция между ферментами и субстратами. Технологические достижения последнего времени позволили выявить ранее неизвестные воздействия метаболитов, которые могут оказывать влияние на функционирование белков. В настоящее время значительные усилия исследователей направлены на изучение свойств малых и средних молекул, которые связываются с определенными белками, изменяя их функции (Dai F. et al., 2012).

В последнее десятилетие изучение взаимодействий белков с малыми молекулами, в частности с метаболитами, запаздывало по сравнению с изучением других типов взаимодействий, таких как белок-белок, белок-ДНК и белок-РНК (Li X. et al., 2013). Только в 2009 году появились первые публикации о

неспецифических взаимодействиях белок–метаболит. Сведения о роли таких эндогенных метаболитов, как пируват, лактат и этанол, участвующих в модулировании функций белков, явно недостаточны. Всё вышеизложенное определило выбор темы настоящего исследования.

Цель исследования: изучить влияние низкомолекулярных естественных метаболитов – пирувата, лактата, этанола – на белок-лигандные взаимодействия и охарактеризовать их регуляторные возможности.

Задачи исследования:

1. Разработать модельную систему для выявления влияния низкомолекулярных метаболитов (пирувата, лактата, этанола) на межмолекулярные взаимодействия с использованием антигенов и антител системы АВ0 крови.

2. Изучить особенности действия пирувата, лактата и этанола на антиген–антительное взаимодействие в модельных вариантах экспериментов: с антигенами А и В эритроцитов человека А(II), В(III) и АВ(IV) групп крови; с естественными анти-А и анти-В антителами плазмы; с анти-А и анти-В моноклональными антителами.

3. Изучить влияние этанола на белок-лигандные взаимодействия ферментов: глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, α-глицеролфосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы в гемолизате цельной крови и в изолированной среде.

4. Охарактеризовать спектр вероятной биологической активности пирувата, лактата, этанола и антигенных детерминант антигенов А и В системы АВ0 методом молекулярного моделирования с использованием программы Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS).

5. Визуализировать и количественно оценить взаимодействия группоспецифических антигенов с антителами системы АВ0 крови в условиях действия пирувата и этанола методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

6. Количественно оценить взаимодействие антиген–антитело системы АВ0 крови в условиях действия пирувата методом проточной цитофлуориметрии.

Научная новизна. Впервые для изучения белок-лигандного взаимодействия в качестве тест-системы использована антиген–антительная система АВ0 крови, а в качестве факторов воздействия – пируват, лактат и этанол. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о модификации взаимодействий антигена с антителом при воздействии пирувата, лактата и этанола, что приводит к регистрируемому изменению степени и скорости агглютинации. Выявлена специфика белок-лигандного взаимодействия, связанная с АВ0-группоспецифическими структурными особенностями антигенов и антител.

Для выявления влияния этанола на белок-лигандные взаимодействия были использованы фермент-субстратные дегидрогеназные системы. Установлено, что активность глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, α-глицеролфосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы как в гемолизате цельной крови, так и в изолированной среде повышалась под влиянием этанола.

Впервые предсказаны многопрофильные биологические активности и оценен резерв метаболических свойств пирувата, лактата и этанола, а также антигенных детерминант антигенов А и В системы АВ0 крови с использованием новых технологий компьютерного моделирования. Благодаря многообразию спрогнозированных биологических эффектов, антигены системы АВ0 открываются с новой перспективной стороны как биологически активные соединения, а не только как группоспецифические антигены, обеспечивающие защиту клеток крови.

Впервые использован новый подход для визуализации межмолекулярного взаимодействия антиген–антитело в условиях влияния биологически активных соединений эндогенного происхождения. С целью визуализации и количественной оценки результатов взаимодействия антигенов и антител при введении малых молекул в систему использованы методы конфокальной лазерной сканирующей микроскопии и проточной цитофлуориметрии.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Полученные новые экспериментальные данные свидетельствуют о влиянии метаболитов, в частности пирувата, лактата и этанола, на процессы межмолекулярного взаимодействия. Доказана информативность использования антиген–антительной системы АВ0 и дегидрогеназной фермент–субстратной системы для количественной оценки белок–лигандного взаимодействия, а также определен характер влияния на эти процессы биогенных веществ. Исследуемые низкомолекулярные компоненты метаболизма способны взаимодействовать с различными белками – антигенами, антителами, каталитическими белками, изменяя их функциональную активность, что может быть использовано для поиска путей коррекции нарушений метаболизма при различных заболеваниях.

Проведенные эксперименты *in vitro*, исследования *in silico* служат основанием для заключения о регуляторном потенциале низкомолекулярных метаболитов, способных влиять на антиген–антительные и метаболические процессы.

Результаты работы внедрены в учебный процесс кафедры биохимии имени академика Т.Т. Березова Медицинского института Российского университета дружбы народов, кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой Самарского государственного медицинского университета, кафедры биохимии Саратовского государственного медицинского университета им. В.И. Разумовского, кафедры биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии Красноярского государственного медицинского университета им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, кафедры биохимии Казанского государственного медицинского университета и используются в практической работе клинико-диагностической лаборатории Клинике Самарского государственного медицинского университета.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработана новая модельная система для изучения белок–лигандного взаимодействия, представленная антигенами и антителами системы АВ0 крови.

Показано специфическое влияние пирувата, лактата и этанола на антиген–антительное взаимодействие.

2. Доказано влияние этанола на белок-лигандные взаимодействия дегидрогеназ: глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, α -глицеролфосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы в гемолизате цельной крови и в изолированной среде.

3. Выявлен широкий спектр биологической активности пирувата, лактата, этанола и детерминант антигенов А и В системы АВ0 крови методом компьютерного моделирования.

4. Установлена возможность использования конфокальной лазерной сканирующей микроскопии и проточной цитофлуориметрии для визуализации и количественной оценки межмолекулярных взаимодействий в условиях влияния биологически активных веществ эндогенного происхождения.

Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора.

Достоверность результатов работы, обоснованность выводов и рекомендаций основываются на достаточном числе наблюдений и адекватной статистической обработке результатов с помощью пакета компьютерных программ Statistical Package for the Social Science (SPSS) 10.0.

Результаты исследований были представлены на Российской конференции «Актуальные проблемы теоретической и прикладной биохимии» (Челябинск, 2009); на Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: геномика, протеомика, биоинформатика» (Новосибирск, 2011; Казань, 2012, 2014); XVI Международной научной конференции «Здоровье семьи в XXI веке» (Будапешт, 2012); Всероссийской научной конференции «Медицинская лабораторная диагностика: будущее и новации» (Санкт-Петербург, 2014); Российской научно-практической конференции «Медицинская биохимия: достижения и перспективы» (Казань, 2015); XXI Всероссийской научно-практической конференции «Качество лабораторных исследований – условие безопасности пациентов» (Москва, 2016), 8th Annual International Congress of Antibodies (КНР, Далянь, 2016); V Съезде биохимиков России (Сочи, 2016).

Диссертационная работа прошла апробацию на кафедре биохимии имени академика Т.Т. Березова Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» и на межкафедральном заседании кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой; кафедры общей, бионеорганической и биоорганической химии и кафедры медицинской биологии, генетики и экологии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет».

Личный вклад автора в получение научных результатов, изложенных в диссертации, состоял в проведении научно-информационного поиска, анализа и обобщения данных литературы по теме диссертационной работы, формулировке цели и задач, а также проведении экспериментов *in vitro* и *in silico* по оценке влияния пирувата, лактата и этанола на белок-лигандные взаимодействия. Участие автора в сборе первичного материала и его обработке – более 80%, обобщении,

анализе и внедрении в практику результатов работы – 100%.

Публикации. Общее количество публикаций 64, по теме диссертации опубликовано 40 научных работ, в том числе 17 статей в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов. Выданы патент РФ № 2484480 и 2 свидетельства о государственной регистрации программы для ЭВМ.

Объем и структура и диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной описанию объектов и методов исследования, трех глав собственных данных, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Диссертация изложена на 312 страницах, иллюстрирована 50 рисунками, содержит 44 таблицы. В работе использовано 696 литературных источников, из них 112 отечественных и 584 зарубежных авторов.

Работа выполнена 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).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Исследования проводились на кафедре биохимии имени академика Т.Т. Березова Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» РУДН, в клинко-диагностической лаборатории Клиник ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет», в лаборатории структурно-функционального конструирования лекарств Научно-исследовательского института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН и на кафедре радиотехнических устройств ФГБОУ ВПО «Самарский государственный аэрокосмический университет имени академика С.П. Королева».

Объектом исследования служила венозная кровь 342 практически здоровых лиц, средний возраст которых составил $26,83 \pm 1,46$ лет. Использовались также следующие материалы исследований:

- наборы стандартных эритроцитов фирмы ReversCell (США);
- наборы моноклональных антител «Эритрогест» (Россия);
- моноклональные антитела TransClone Anti-AB01 (A), TransClone Anti-AB02 (B), TransClone Anti-AB03 (AB) (BIO-Rad, США);
- антитела для проточной цитофлуориметрии: Blood group A antigen (Z2A), Blood group B antigen (89-F), меченные флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) (Santa Cruz biotechnology, США);
- наборы реагентов для определения концентрации пирувата (Roche-Diagnostics, Швейцария), лактата (ЕКF-diagnostic, Германия), эндогенного этанола ЕТОН2 (Roche-Diagnostics, Германия) и количества эритроцитов в крови (Roch-Diagnostics, Германия);
- контрольные сыворотки Precinorm и Precipat (Roche-Diagnostics, Германия);

- гомогенные препараты ферментов ГАФД, α -ГФД и ЛДГ производства фирмы ICN Biomedicals (США);

- растворы: пирувата натрия (Sigma-Aldrich, Japan), лактата натрия (Biomedicals, France) и этиловый спирт.

В работе использовались иммунологические, биохимические и высокотехнологичные методы исследования - конфокальная лазерная сканирующая микроскопии и проточная цитофлуориметрия, компьютерные методы исследования и статистические методы обработки данных.

Типирование групп крови по системе АВ0 проводили методом прямой агглютинации на плоскости с использованием наборов «Эритрогест–Цоликлоны» и на автоматическом анализаторе «Хемос СП II» для проведения иммуногематологических исследований (BIO-Rad, США) с использованием моноклональных антител TransClone (BIO-Rad, США), согласно «Методическим рекомендациям по определению групп крови АВ0» (утверждены 27.04.1999 гематологическим научным центром РАМН).

Определение концентрации пирувата в сыворотке крови осуществляли на автоматическом биохимическом анализаторе Hitachi – 902 фирмы Roche-Diagnostics (Япония). Концентрацию лактата в сыворотке крови определяли электрохимическим методом на анализаторе BIOSEN C line фирмы EKF-diagnostic, GmbH (Германия). Определение концентрации эндогенного этанола в сыворотке крови проводили на биохимическом анализаторе COBAS INTEGRA 400 плюс фирмы Roche-Diagnostics (Германия).

Тест-системой для изучения белок-лигандного взаимодействия являлась система групп крови АВ0. Для изучения влияния пирувата, лактата и этанола на антигены А и В эритроцитов крови, естественные анти-А и анти-В антитела плазмы крови и моноклональные анти-А и анти-В антитела применяли алгоритм исследования, представленный в таблице 1.

Таблица 1. Алгоритм исследования влияния метаболитов на антиген–антительное взаимодействие

100 мкл цельной крови инкубировали 5 мин	100 мкл плазмы инкубировали 5 мин	100 мкл раствора моноклональных антител инкубировали 5 мин
Раздельно: с 20 мкл пирувата (2 мМ), лактата (2 мМ), этанола (0,3 мМ)		
Проводили реакцию агглютинации со стандартными моноклональными антителами	Проводили реакцию агглютинации со стандартными эритроцитами А(II)-АВ(IV) групп крови	Проводили реакцию агглютинации со стандартными эритроцитами А(II)-АВ(IV) групп крови

Влияния пирувата, лактата и этанола на антиген–антительное взаимодействие оценивали по двум показателям: степени агглютинации и времени наступления агглютинации. Степень агглютинации подсчитывали по бальной шкале с индикацией степени агглютинации и числовой оценкой интенсивности агглютинации (pt) по W.L. Marsh (Marsh W.L., 1972). Время наступления агглютинации измеряли с помощью секундомера в секундах – от момента перемешивания составляющих до появления первых признаков агглютинации. Концентрацию метаболитов определяли методом подбора, от низких концентраций до концентраций метаболитов, при которых изменялись показатели агглютинации эритроцитов. Время инкубации определяли экспериментально, основываясь на том, за какое время все молекулы исследуемых метаболитов вступили во взаимодействие с антигенами и антителами. Показатели агглютинации не изменялись при удлинении времени инкубации.

Активность ферментов определяли на спектрометре LAMBDA 20 (Perkin Elmer, Швейцария). Внутрилабораторный контроль качества исследований осуществляли с использованием контрольных сывороток Precinorm и Precipat фирмы Roche Diagnostics (Германия). Для постановки эксперимента использовали гемолизат, полученный из цельной крови клинически здоровых лиц, а также гомогенные препараты ферментов глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (ГАФД), α -глицеролфосфатдегидрогеназы (α -ГФД) и лактатадегидрогеназы (ЛДГ) производства фирмы ICN Biomedicals (США). Для получения гемолизата 100 мкл цельной крови вносили в 0,9 мл бидистиллированной воды, охлажденной до 0⁰С. Алгоритм исследования влияния этанола на активность дегидрогеназ представлен в таблице 2.

Таблица 2. Алгоритм исследования влияния этанола на активность дегидрогеназ

10 мкл гемолизата цельной крови инкубировали 20 мин	10 мкл ферментного препарата ГАФД, α -ГФД, ЛДГ инкубировали 20 мин
С этанолом в концентрации 0,3 мМ при температуре 25 ⁰ С	
Активность дегидрогеназ определяли спектрофотометрически, в основу метода определения были положены различия спектров поглощения света восстановленной и окисленной формами никотинамидадениндинуклеотида	

Оценка биологической активности соединений проводилась с помощью компьютерной системы Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS) (<http://www.ibmh.msk.su/PASS/>) Прогноз спектра биологической активности органических соединений проводили совместно с лабораторией структурно-функционального конструирования лекарств (заведующий – профессор В.В.

Поройков) НИИ Биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН. Биологическую активность описывали в PASS качественным образом, результат прогноза помимо названий активности включал оценки вероятностей наличия (P_a) и отсутствия каждой активности (P_i), имеющие значения от 0 до 1.

Визуализацию антиген–антительного взаимодействия осуществляли с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, реализованной при помощи экспериментального стенда, состоящего из конфокального микроскопа Olympus IX 71 (Olympus, Япония), сканирующего блока и лазерного комбайна (ANDOR, Япония). Анализ данных интенсивности флуоресценции комплексов антиген–антитело системы АВ0, меченных ФИТЦ, осуществляли с помощью компьютерной программы Europe Medical Biological Image (2011). Определение интенсивности флуоресценции агглютинатов эритроцитов проводили на двухканальном проточном цитофлуориметре FACS Calibur компании Beckton Dickinson (США). Прибор калибровался частицами CaliBRAITE в программном обеспечении FACSComp. Полученные результаты обрабатывались с помощью программы CellQuest pro.

Статистическую обработку полученных результатов проводили на персональном компьютере с помощью пакета прикладных программ Statistical Package for the Social Science (SPSS) 10.0 (<http://www.spss-statistics.ru>). По результатам предварительного статистического анализа данных определяли методологию, которую необходимо применять для обработки результатов исследований, используя параметрическую или непараметрическую статистику. Критическое значение уровня значимости принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние метаболитов: пирувата, лактата и этанола на белок-лигандные взаимодействия. В качестве объекта изучения информационно-регуляторной роли низкомолекулярных метаболитов на процессы белок-лигандного взаимодействия выбраны два типа белков: во-первых, антигены системы АВ0 крови (степень и время образования комплексов с антителами определяется структурно-конформационным соответствием антигенов и антител), и, во-вторых, ферменты, функция которых реализуется каталитической активностью. Факторами, регуляторный потенциал которых оценивался, выбраны низкомолекулярные метаболиты эндогенной природы: пируват, лактат и этанол - характеризующиеся высокой химической активностью.

Для решения поставленной задачи была разработана новая модельная система, представленная антигенами А, В и анти-А-, анти-В- антителами. Сущность изобретения заключается в том, что в способе оценки действия биологически активных веществ на антиген–антительное взаимодействие, основанном на взятии цельной крови, стабилизированной антикоагулянтом, к образцам цельной крови А(II)–АВ(IV) групп крови добавляют биологически активное вещество, инкубируют в течение 3-5 минут, вносят стандартные анти-А или анти-В моноклональные антитела и спустя 3-5 минут по бальной шкале с

индикацией степени агглютинации по W.L.Marsh определяют степень агглютинации соответствующей группы крови (патент на изобретение № 2484480 от 10.06.2013). Данная тест-система послужила основой для оценки влияния исследуемых низкомолекулярных метаболитов на взаимодействие антиген–антитело системы АВ0 крови.

Перед проведением серии экспериментов была определена концентрация пирувата, лактата и этанола в сыворотке крови практически здоровых лиц с различными группами крови. Колебания концентрации исследуемых метаболитов в сыворотке крови у лиц с различной групповой принадлежностью были незначительны и не влияли на результаты исследований.

Полученные результаты исследований, проведенных с антигенами А и В эритроцитов А(II), В(III) и АВ(IV) групп крови, с анти-А и анти-В антителами плазмы, с анти-А и анти-В моноклональными антителами, показали, что характер связывания антиген–антитело зависит от присутствия в среде пирувата, лактата или этанола.

Влияние метаболитов на антигены А и В эритроцитов крови. В серии экспериментов с группоспецифическими антигенами эритроцитов показано, что под влиянием исследуемых метаболитов изменялись степень и время начала агглютинации эритроцитов крови. Изменение степени агглютинации антигенов А и В эритроцитов А(II), В(III) и АВ(IV) групп крови под влиянием пирувата, лактата и этанола представлено на рисунке 1.

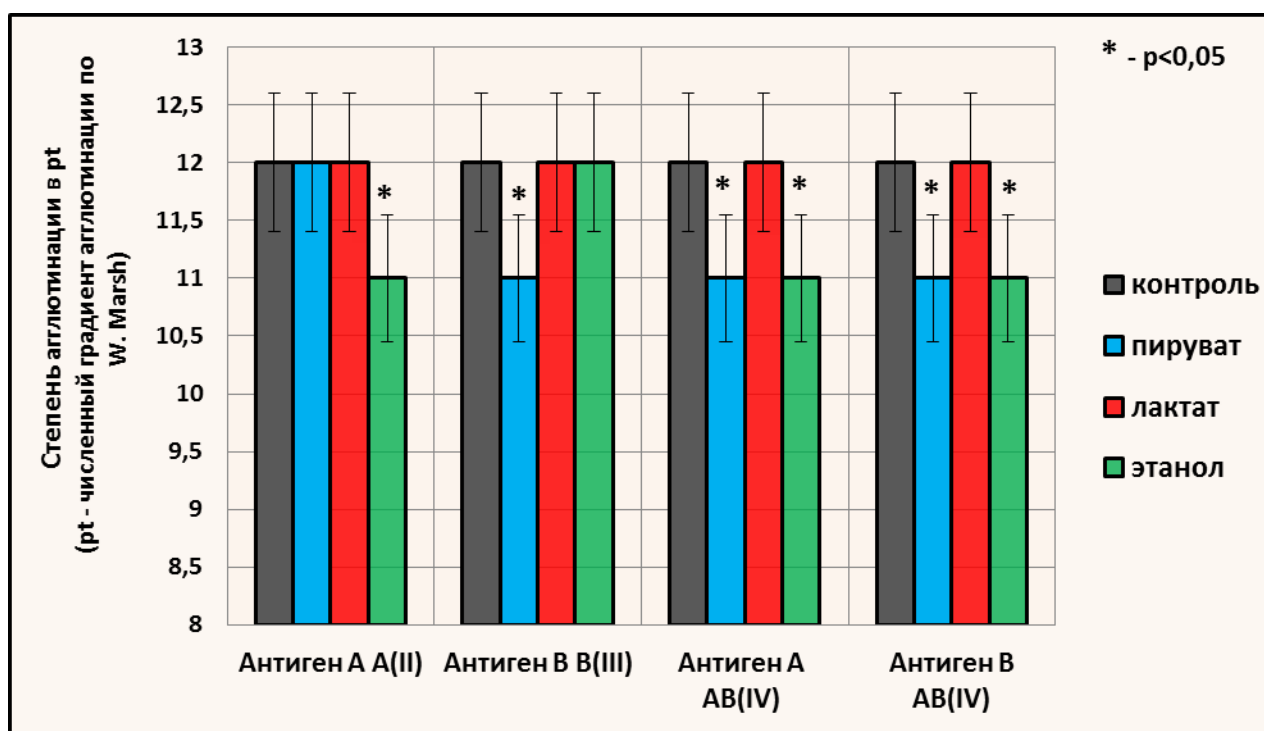


Рисунок 1. Влияние метаболитов на степень агглютинации антигенов А и В эритроцитов А(II), В(III) и АВ(IV) групп крови

Установлено, что под влиянием пирувата снизилась на 8,4% степень агглютинации эритроцитов В(III) и АВ(IV) групп крови, а под действием этанола снизилась степень агглютинации эритроцитов А(II) и АВ(IV) групп крови (также на 8,4%). Таким образом, выявлена тенденция к однонаправленному характеру сдвига степени агглютинации группоспецифических антигенов А и В эритроцитов крови, а именно к снижению под воздействием пирувата и этанола. Лактат не влиял на данный показатель агглютинации эритроцитов.

Время начала агглютинации эритроцитов А(II), В(III) и АВ(IV) групп крови под влиянием пирувата, лактата и этанола отклонялось от контрольных значений более значительно, чем степень агглютинации (рис. 2).

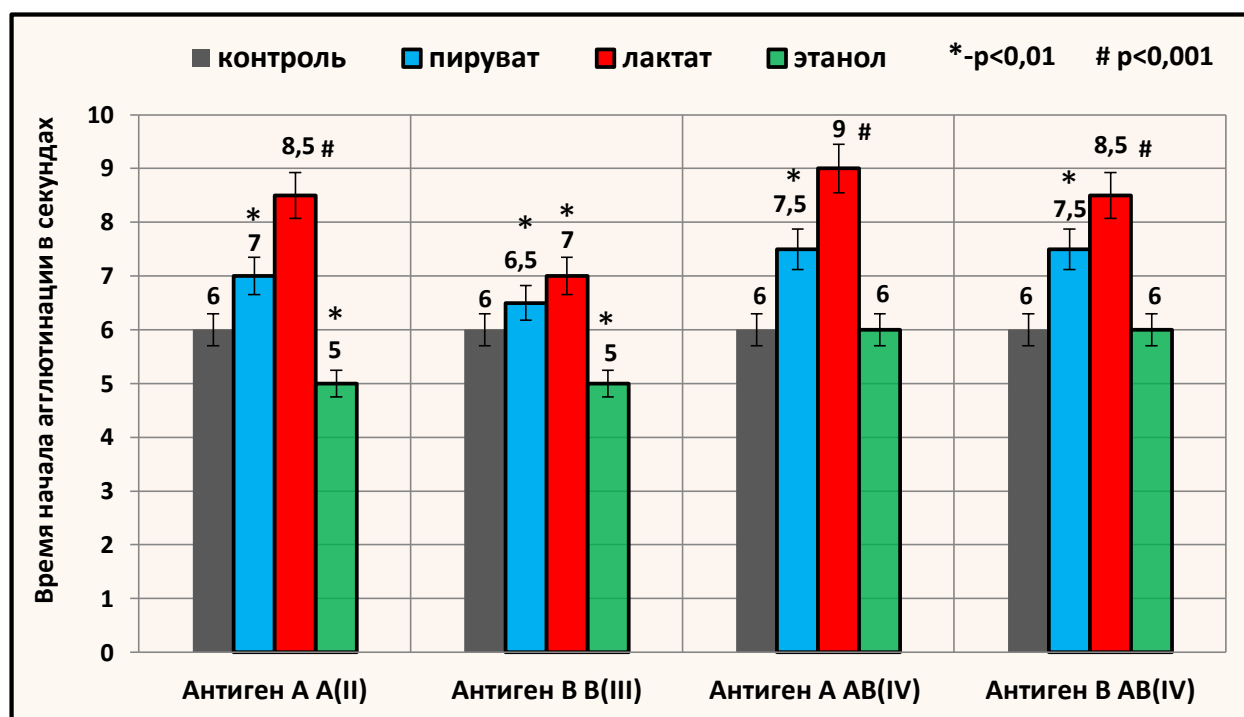


Рисунок 2. Влияние метаболитов на время начала агглютинации антигенов А и В эритроцитов А(II), В(III) и АВ(IV) групп крови

Пируват и лактат увеличивали время начала агглютинации антигенов А и В эритроцитов крови. Антигены А А(II) и АВ(IV) групп крови медленнее вступали во взаимодействие с антителами, чем антигены В В(III) и АВ(IV) групп крови, что можно объяснить разной структурной организацией антигенных детерминант. Под действием этанола снижалось время наступления агглютинации эритроцитов А(II) и В(III) групп крови.

Полученные результаты свидетельствуют о разнонаправленном действии метаболитов на время начала агглютинации группоспецифических антигенов эритроцитов с антителами: под влиянием пирувата и лактата антигены А и В эритроцитов А(II), В(III) и АВ(IV) групп крови медленнее вступали во взаимодействие с антителами, а под действием этанола процесс агглютинации эритроцитов А(II), В(III) групп крови протекал быстрее.

Влияние лактата на время начала агглютинации эритроцитов выражено сильнее, чем пирувата и этанола во всех исследуемых группах крови.

Изменение показателей агглютинации эритроцитов под влиянием исследуемых соединений, возможно, связано с конформационной модификацией антигенов в связи с изменившимся микроокружением, что может и определять их реакционную способность.

Влияние метаболитов на анти-А и анти-В антитела плазмы. Несколько другой эффект вызывает воздействие пирувата, лактата и этанола на естественные анти-А и анти-В антитела плазмы крови (рис. 3).

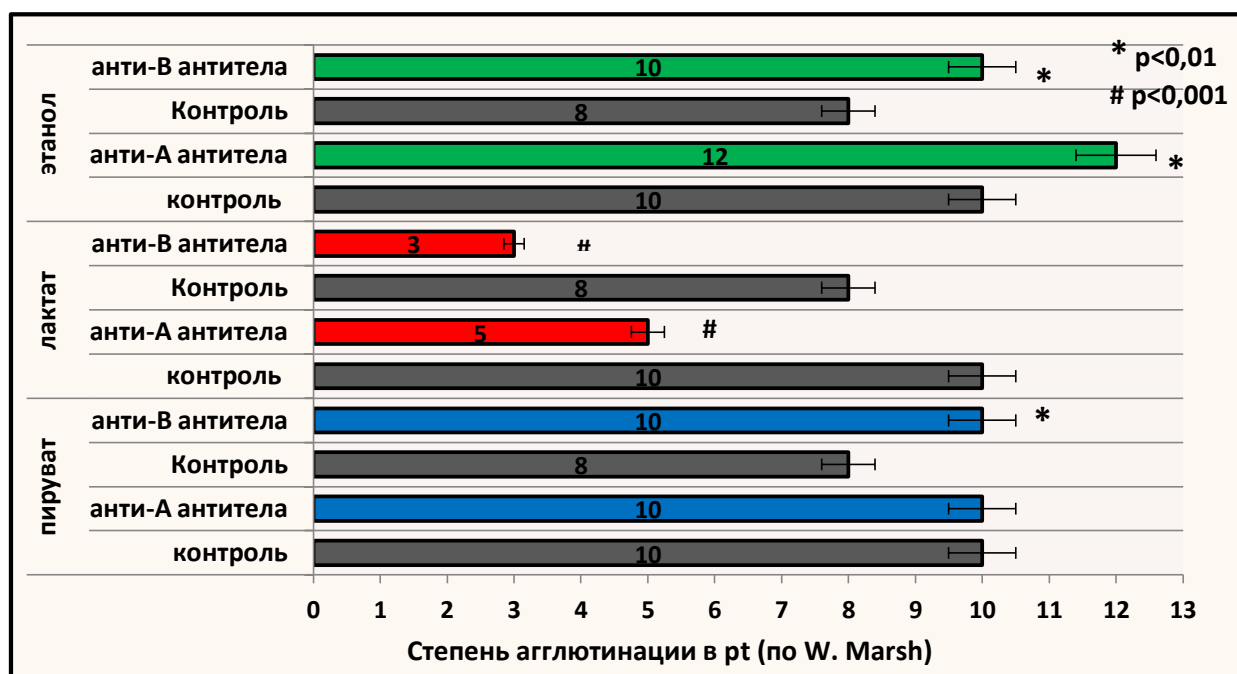


Рисунок 3. Влияние метаболитов на степень агглютинации анти-А и анти-В антител плазмы крови

Показано, что под влиянием пирувата увеличивалась степень агглютинации только анти-В антител, а под действием лактата снижалась степень агглютинации как анти-А, так и анти-В антител плазмы. Этанол увеличивал данный показатель агглютинации анти-А и анти-В антител плазмы с эритроцитами А(II) и В(III) групп крови. По-видимому, исследуемые метаболиты оказывают модифицирующее действие на структуру иммуноглобулинов, вследствие чего изменяется сродство антитела к антигену.

Влияние метаболитов на анти-А и анти-В моноклональные антитела. Влияние метаболитов на степень агглютинации анти-А и анти-В моноклональных антител с эритроцитами А(II), В(III) и АВ(IV) групп крови показано на рисунке 4. Степень агглютинации моноклональных антител с эритроцитами А(II), В(III) и АВ(IV) групп крови не изменялась под действием пирувата и этанола, но снижалась на 75% под влиянием лактата.

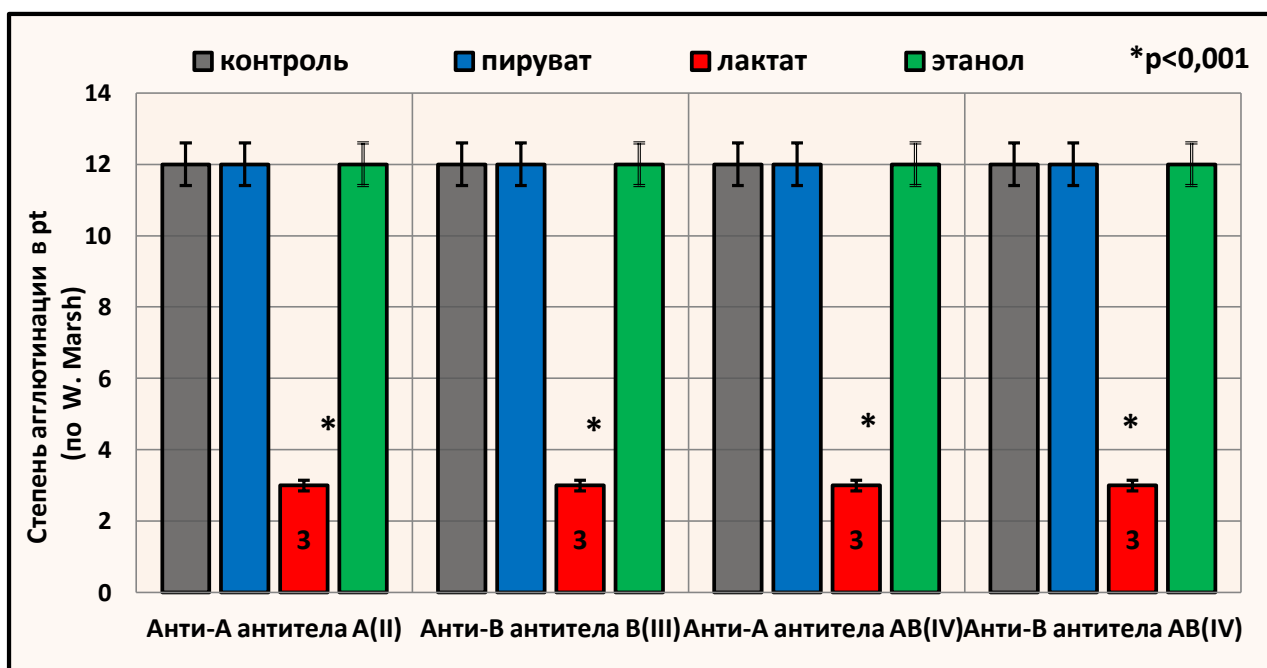


Рисунок 4. Влияние метаболитов на степень агглютинации анти-А и анти-В моноклональных антител

Время начала агглютинации моноклональных антител с эритроцитами всех исследуемых групп крови изменялось значительно сильнее под влиянием лактата, чем пирувата и этанола (рис. 5).

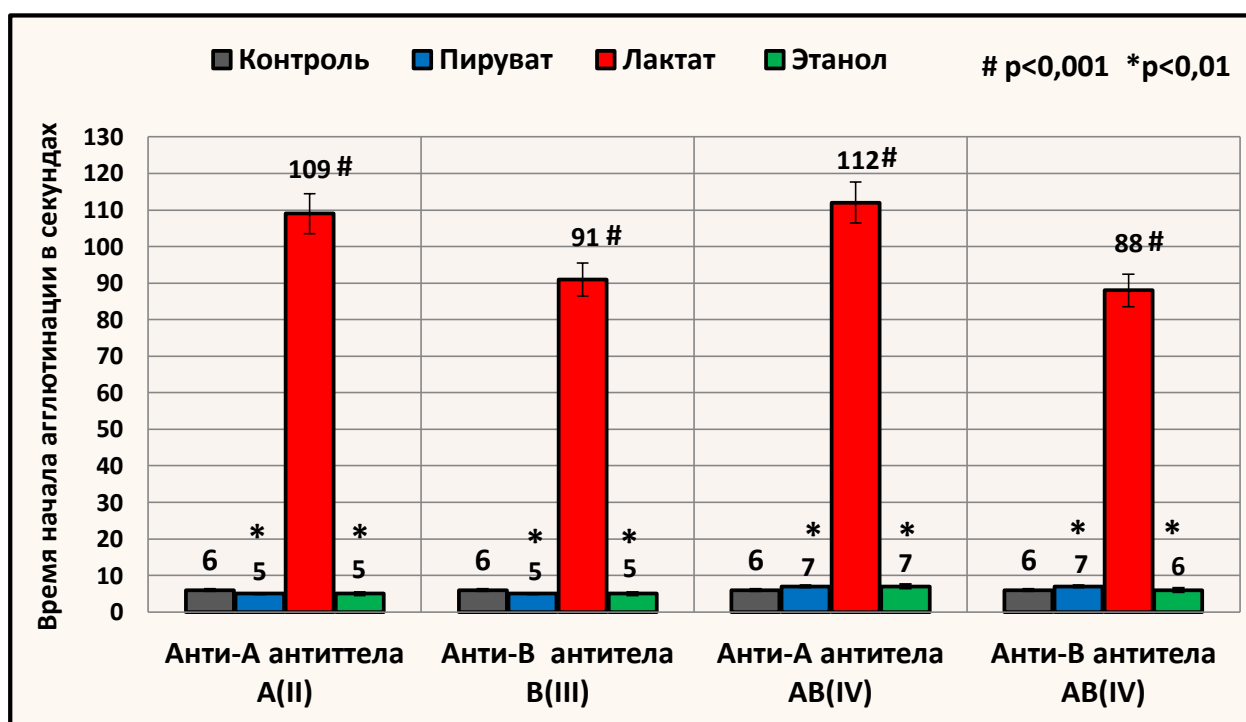


Рисунок 5. Влияние метаболитов на время начала агглютинации анти-А и анти-В моноклональных антител с эритроцитами A(II), B(III) и АВ(IV) групп крови

После инкубации отдельно с пируватом и этанолом анти-А и анти-В моноклональные антитела быстрее вступали во взаимодействие с эритроцитами А(II) и В(III) групп крови (время начала агглютинации уменьшалось) и медленнее с эритроцитами АВ(IV) группы крови (время начала агглютинации увеличивалось), за исключением анти-В антител к АВ(IV) группе крови, которые не реагировали на присутствие в среде этанола.

Под влиянием лактата время наступления агглютинации анти-А и анти-В моноклональных антител с эритроцитами А(II), В(III) и АВ(IV) групп крови существенно увеличивалось, а именно в 15-20 раз.

Полученные данные в трех сериях модельных экспериментов показывают, что низкомолекулярные метаболиты – пируват, лактат и этанол за счет прямых и опосредованных эффектов изменяют антиген–антительное взаимодействие, что доказывается колебаниями двух показателей реакции агглютинации – степени и времени начала агглютинации эритроцитов. Индивидуальные отличия параметров – степени и времени начала агглютинации обусловлены, очевидно, различием строения антигенов АВ0 и антител к ним.

Несмотря на кажущуюся простоту антигенной системы АВ0, включающей два антигена А и В и два антитела, большую роль в ее функционировании играет конформационная специфичность антиген–антительного взаимодействия, а также ближайшее окружение малых молекул с различными свойствами.

Влияние эндогенного метаболита – этанола на фермент-субстратные взаимодействия. В качестве объекта дальнейшего изучения информационно-регуляторной роли метаболитов на белок-лигандные взаимодействия были выбраны фермент-субстратные взаимодействия дегидрогеназ. Фактором, действие которого оценивалось, являлся этанол, низкомолекулярный метаболит с высокой реакционной способностью. Установлено, что под влиянием этанола увеличивалась активность глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, α-глицеролфосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы как в гемолизате крови, так и в изолированной среде.

Полученные результаты показали, что повышение активности ГАФД, α-ГФД и ЛДГ в присутствии этанола в гемолизате крови значительно больше, чем в изолированной среде. Таким образом, многокомпонентная среда – гемолизат – способствует большей активации исследуемых дегидрогеназ под влиянием внешнего фактора воздействия. Оценка активности ГАФД, α-ГФД и ЛДГ в гемолизате крови и в изолированной среде (препараты ферментов) под влиянием этанола представлена на рисунке 6.

Сравнивая активацию этанолом всех трех ферментов, следует отметить менее выраженное влияние на α-ГФД. При одинаковой доступности этих ферментов модулирующие эффекты этанола могут зависеть от различной структурной организации каталитических белков: ГАФД и ЛДГ – тетрамерные молекулы, а α-ГФД – димер.

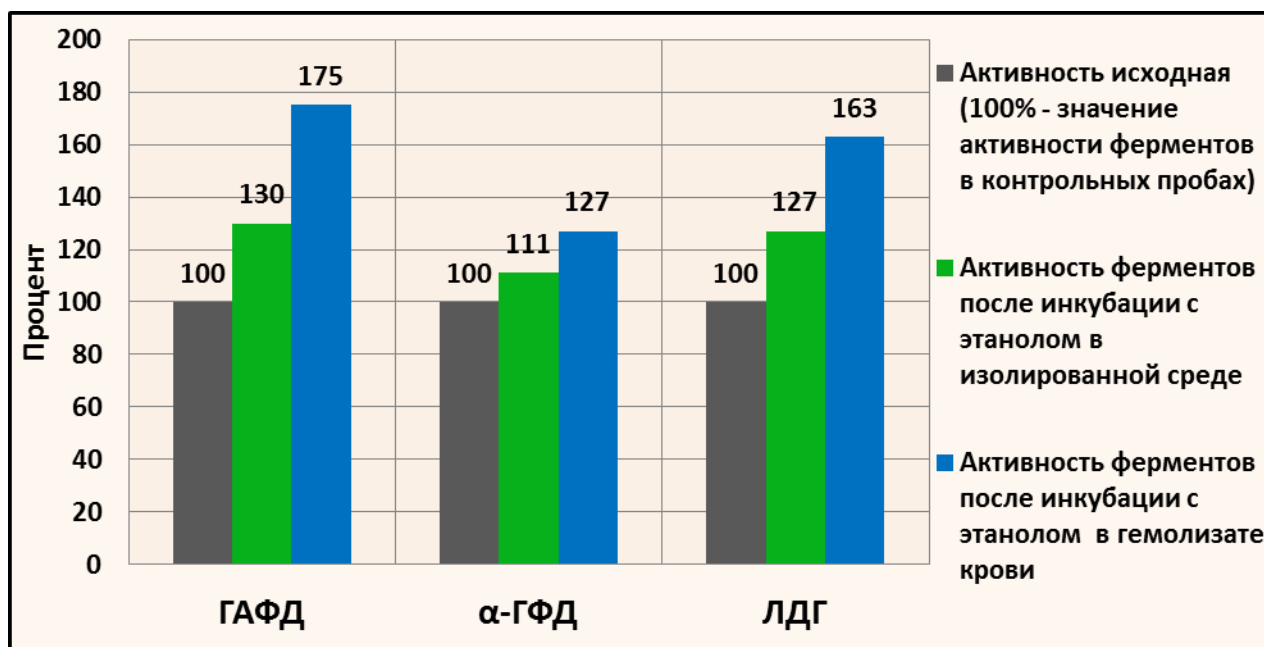


Рисунок 6. Сравнительная оценка влияния этанола на активность ГАФД, α-ГФД и ЛДГ в гемолизате крови и в изолированной среде (за 100% принята активность дегидрогеназ в контроле)

Прогнозирование биологической активности пирувата, лактата и этанола, а также антигенных детерминант антигенов А и В методом молекулярного моделирования. Одной из предпосылок для понимания функций молекул является всестороннее изучение характера и механизма их взаимодействия. Для прогнозирования биологической активности метаболитов и антигенных детерминант А и В мы использовали компьютерную программу Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS), основанную на анализе взаимосвязи «структура–активность» и разработанную в НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича.

Прогнозирование биологической активности пирувата, лактата и этанола. С помощью программы PASS предсказаны многопрофильные и разнообразные биологические эффекты исследуемых низкомолекулярных метаболитов. Анализ данных спрогнозированной биологической активности метаболитов показал широкий спектр вероятных фармакологических эффектов и молекулярных механизмов их реализации с количественной и качественной разницей. По результатам прогноза установлено, что пируват может проявлять 1926 видов биологической активности, лактат – 1792, а этанол – 2000. Вероятность наличия фармакологических эффектов для пирувата – 257, для лактата – 243, для этанола – 300. Количество вероятных молекулярных механизмов действия у пирувата – 1578, у лактата – 1434 и у этанола – 1606. Этанолу присуще самое большое количество молекулярных механизмов действия, а также побочных, токсических эффектов, а лактату – метаболически опосредованных действий.

Анализ вероятной биологической активности метаболитов показал качественную разницу выявленных биологических эффектов (рис. 7).

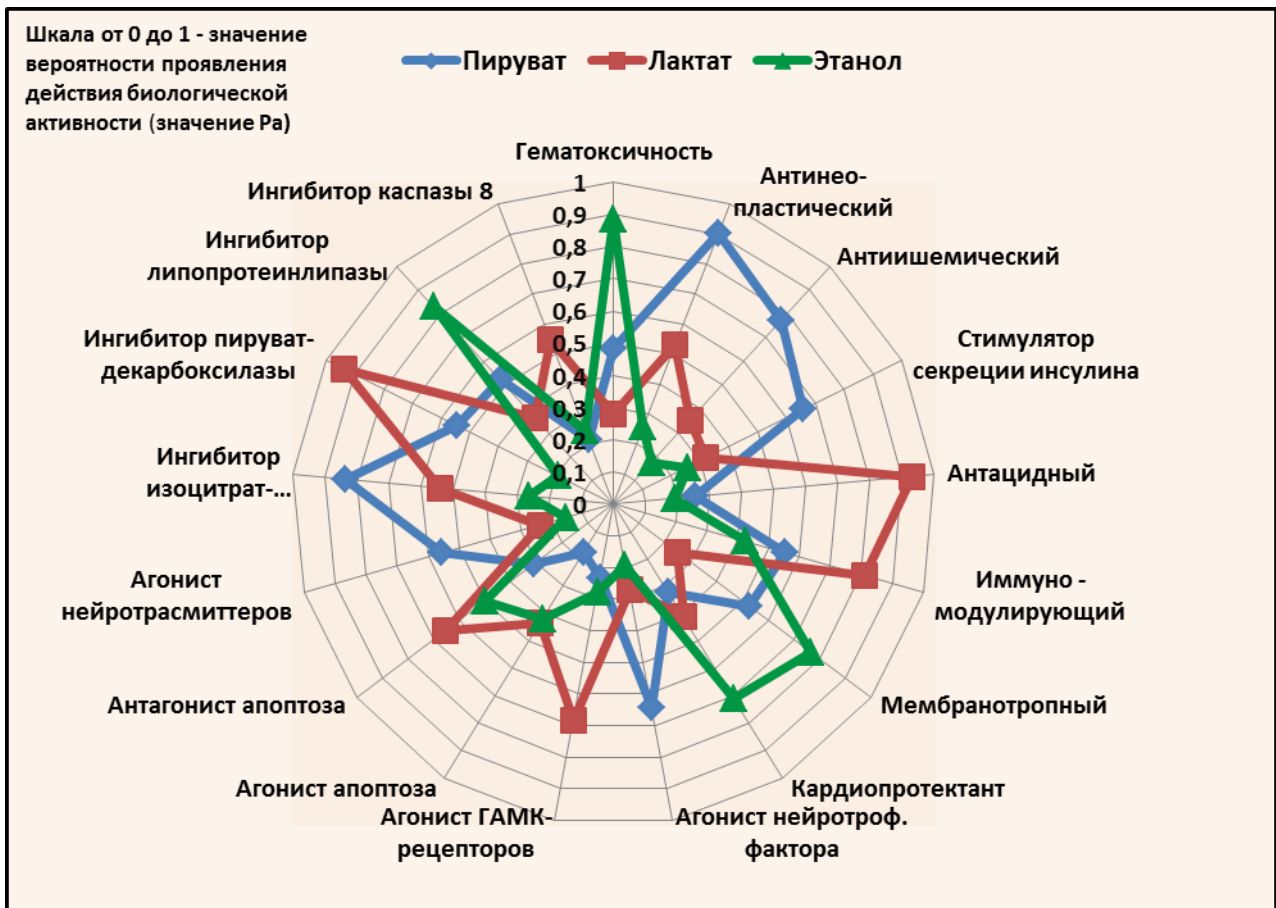


Рисунок 7. Качественная разница выявленных биологических эффектов метаболитов

Для пирувата предсказаны антинеопластический и антиишемический фармакологические эффекты, он способен выступать стимулятором секреции инсулина, агонистом нейротрофического фактора и антагонистом нейротрансмиттеров, ингибитором изоцитратдегидрогеназы.

Для лактата спрогнозированы антацидный и иммуномодулирующий фармакологические эффекты, он способен выступать агонистом ГАМК-рецепторов, антагонистом апоптоза, ингибитором пируватдекарбоксилазы и каспазы 8.

Предсказано, что этанол обладает мембранотропным, кардиопротекторным и гематоксическим действием, он способен быть агонистом апоптоза, ингибитором липопротеинлипазы.

Важным фактом является вероятная способность метаболитов выступать агонистом/антагонистом рецепторов и факторов, регулирующих внутри- и межклеточные взаимодействия (табл. 3).

Таблица 3. Спрогнозированная биологическая активность метаболитов – быть агонистом/антагонистом (значение P_a – вероятность проявления действия), знак «-» означает отсутствие биологического эффекта

Биологические эффекты	Пируват ($P_a > 0,5$)	Лактат ($P_a > 0,5$)	Этанол ($P_a > 0,5$)
Агонист инсулиноподобного фактора роста	0,685	0,778	0,668
Агонист фактора роста нервов	-	0,690	0,652
Агонист нейротрофического фактора	0,644	-	-
Агонист фактора некроза опухоли	-	0,608	-
Агонист нейротрансмиттеров	-	0,588	-
Антагонист нейротрансмиттеров	0,699	-	0,586
Агонист ГАМК-рецепторов	-	0,686	-
Антагонист ГАМК-рецепторов	0,627	-	0,555
Антагонист никотиновых ацетилхолиновых рецепторов	0,668	-	-
Антагонист рецепторов фибриногена	0,522	0,802	0,561
Антагонист апоптоза	-	0,701	-
Агонист апоптоза	-	-	0,616
Агонист α -интерферона	-	0,556	0,535
Антагонист интегрина	0,680	-	-
Агонист кальциевых каналов	-	0,545	-

Очевидно, что исследуемые метаболиты могут взаимодействовать с разными рецепторами и факторами, модифицируя их состояние, что может приводить к изменению биологической активности.

Спрогнозировано, что этанол способен проявлять больше токсических и побочных эффектов, чем пируват и лактат. Этанол может выступать вероятным иммуносупрессантом (Ра 0,506), галлюциногеном (Ра 0,507), конвульсантом (Ра 0,592) и коагулянтом (Ра 0,513) и проявлять гепатотоксичное действие (Ра 0,886).

Лактат с высокой степенью вероятности может проявлять гипергликемический (Ра 0,775), бронхоконстрикторный (Ра 0,704) и гипертермический (Ра 0,675) эффекты, а пируват может оказывать гиперхолестеринемическое (Ра 0,757) и тератогенное (Ра 0,512) действия.

Не исключено, что в организме в сложной сети взаимоотношений высоко- и низкомолекулярных соединений пируват, лактат и этанол могут выполнять функции, еще не установленные экспериментально, но уже спрогнозированные, обеспечивая, таким образом, динамичность и равновесие обменных и физиологических процессов.

Прогнозирование биологической активности антигенных детерминант антигенов А и В. Оценить биологическую активность антигенных детерминант антигенов А и В очень сложно экспериментально, но такая возможность появилась благодаря новым технологиям компьютерного моделирования.

Анализ спектра вероятной биологической активности антигенных детерминант А и В показал, что антигенная детерминанта А обладает меньшим числом фармакологических эффектов, у нее ниже метаболически опосредованные и транспорт-обусловленные активности, а также менее выражено регуляторное влияние на экспрессию генов по сравнению с аналогичными видами активностей для антигенной детерминанты В.

Многие спрогнозированные биологические эффекты свойственны обоим антигенным детерминантам, но характеризуются разной степенью вероятности проявления действия (значение Ра) (рис. 8).

Антигенная детерминанта В с большей степенью вероятности может проявлять биологическую активность, выступая в качестве агониста проницаемости мембран, стимулятором ангиогенеза, вазопротектором, а также иммуностимулятором с антивирусным эффектом, демонстрирует более выраженные свойства агониста гиалуриновой кислоты и фактора роста нервов, агониста α -интерферона и интерлейкина-2, что определяет последний как потенциально более вероятный биорегулятор, а также оказывает меньше ингибирующее действие на активность некоторых ферментов.

Анализируя полученные данные компьютерного прогноза, можно сделать вывод, что иммунохимическая специфичность антигенных детерминант антигенов А и В реализуется характерной и многообразной биологической активностью.

В целом молекулярное прогнозирование позволяет расширить фундаментальные знания об известных свойствах исследуемых метаболитов и антигенных детерминант антигенов А и В, а также предсказать возможные биологические эффекты и молекулярные механизмы их реализации в процессах сложных взаимодействий между макро- и микромолекулами.

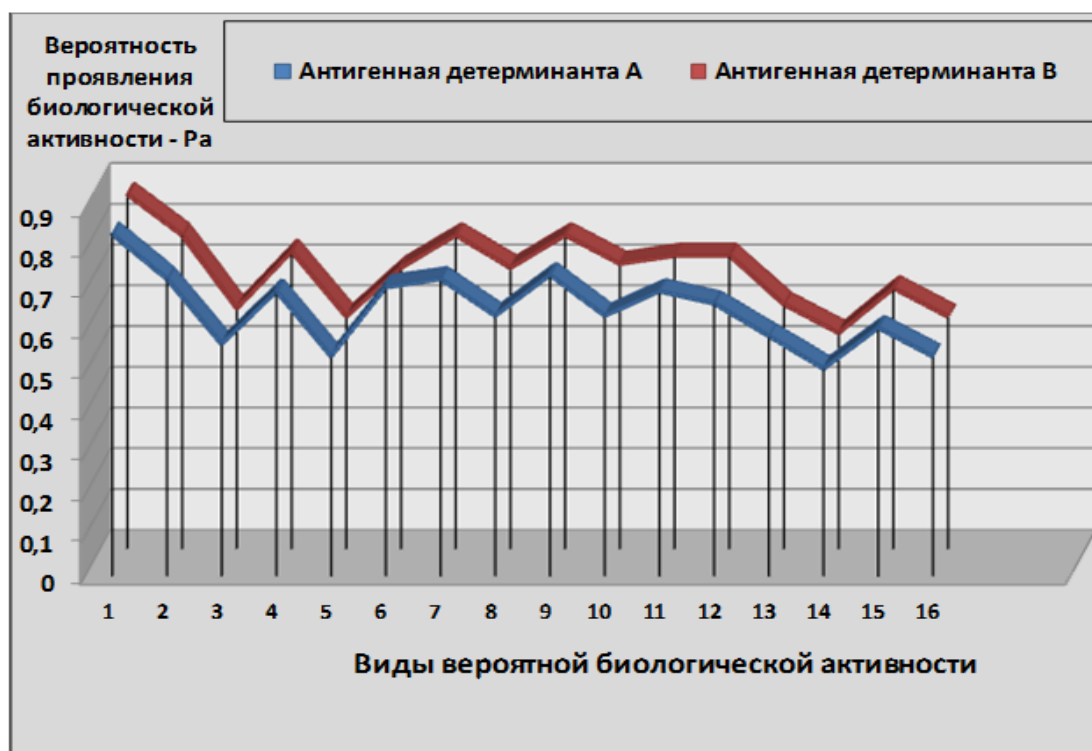


Рисунок 8. Сравнительная оценка вероятности проявления биологического эффекта антигенных детерминант А и В:

- 1 – агонист проницаемости мембран;
- 2 – иммуностимулирующий эффект;
- 3 – стимулятор ангиогенеза;
- 4 – вазопротекторный эффект;
- 5 – противовирусный эффект;
- 6 – антибактериальный эффект;
- 7 – нефротоксический эффект;
- 8 – кардиотоксический эффект;
- 9 – гипокалиемический эффект;
- 10 – бронхоконстрикторный эффект;
- 11 – агонист гиалуроновой кислоты;
- 12 – агонист фактора роста нервов;
- 13 – агонист α -интерферона;
- 14 – агонист интерлейкина-2;
- 15 – ингибитор долинхолгликотрансферазы;
- 16 – ингибитор ганглиозидгалактозилтрансферазы

Визуализация комплексов антиген–антитело и оценка характера действия метаболитов на антиген–антительное взаимодействие системы АВ0 крови с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии и проточной цитофлуориметрии. Впервые, с целью оценки белок-лигандных взаимодействий, были применены современные высокотехнологичные методы: конфокальная лазерная сканирующая микроскопия и проточная цитофлуориметрия.

Визуализация комплексов антиген–антитело и оценка характера действия метаболитов на антиген–антительное взаимодействие методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия является относительно новой технологией для получения микроскопического изображения межмолекулярных и межклеточных взаимодействий. Нами впервые использовалась конфокальная микроскопия для исследования взаимодействия группоспецифических антигенов крови с антителами системы АВ0. Полученные с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии электронные микрофотографии позволили непосредственно наблюдать комплексы антиген–антитело системы АВ0 крови, а диаграммы распределения интенсивности флуоресценции комплексов антигенов с антителами, меченных ФИТЦ, дали возможность провести количественную оценку влияния пирувата и этанола на процесс агглютинации группоспецифических антигенов эритроцитов с антителами.

Микрофотографии образования комплексов антиген–антитело эритроцитов А(II) и В(III) групп крови в режиме флуоресценции до и после инкубации с пируватом и этанолом (раздельно) представлены на рисунках 9 и 10.

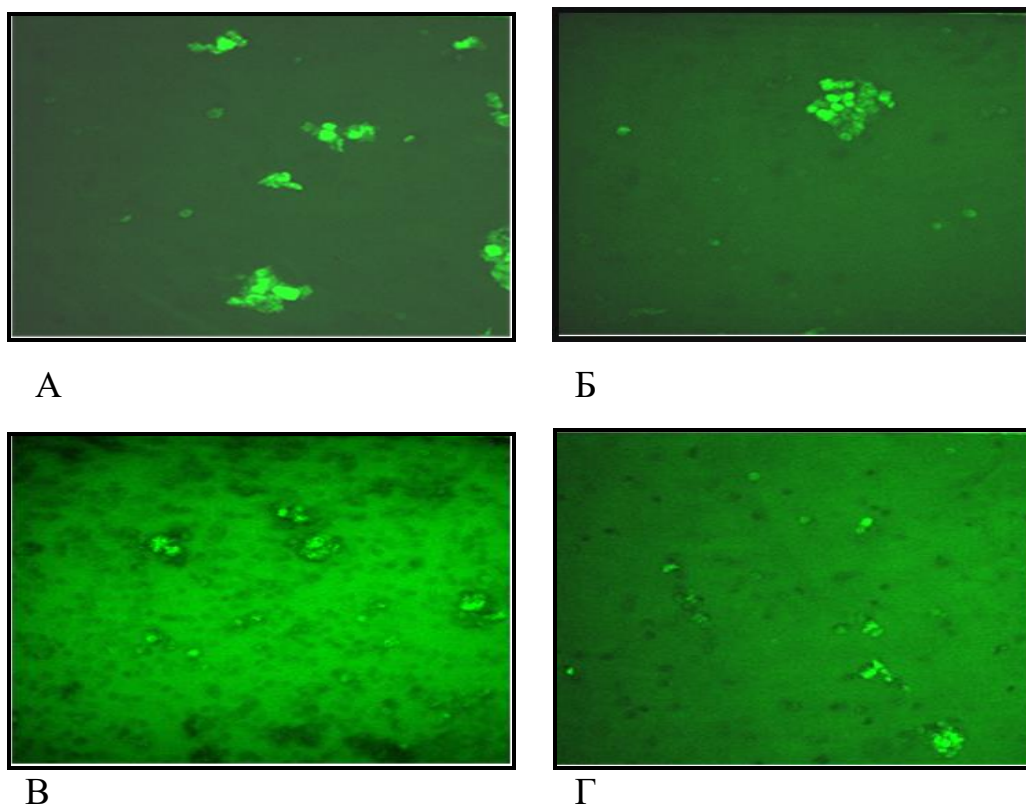


Рисунок 9. Микрофотографии образования комплексов антиген–антитело эритроцитов А(II) и В(III) групп крови в режиме флуоресценции:
А – эритроциты А(II) группы крови (контрольный образец);
Б – эритроциты А(II) группы крови после инкубации с пируватом;
В – эритроциты В(III) группы крови (контрольный образец);
Г – эритроциты В(III) группы крови после инкубации с пируватом

На микроснимках комплексы агглютинатов эритроцитов А(II) группы крови с антителами, в присутствии пирувата, имеют больший размер, чем комплексы агглютинатов в контрольном образце, но их меньше. По сравнению с антигеном А, в присутствии пирувата антиген В эритроцитов В(III) группы крови образует меньше комплексов с антителом как по количеству, так и по размеру.

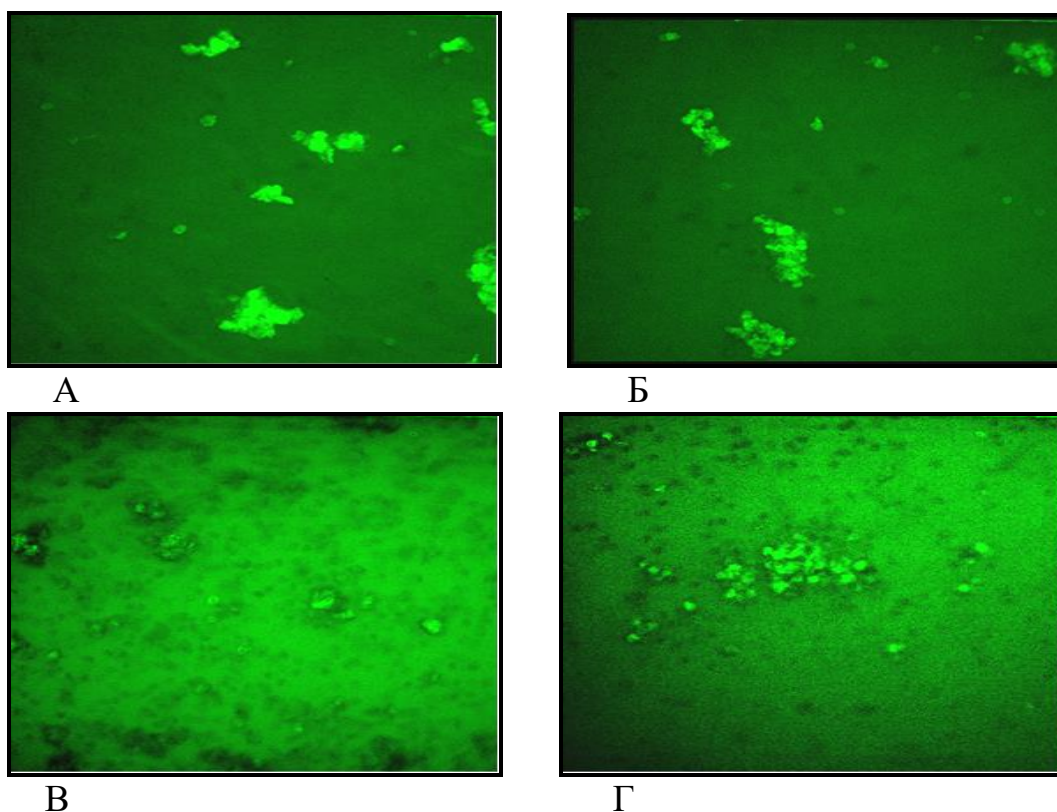


Рисунок 10. Микрофотографии образования комплексов антиген–антитело эритроцитов А(II) и В(III) групп крови в режиме флуоресценции:
А – эритроциты А(II) группы крови (контрольный образец);
Б – эритроциты А(II) группы крови после инкубации с этанолом;
В – эритроциты В(III) группы крови (контрольный образец);
Г – эритроциты В(III) группы крови после инкубации с этанолом

Анализ микрофотографий комплексов антиген–антитело в образцах эритроцитов А(II) и В(III) групп крови показал, что под влиянием этанола увеличивалось только количество иммунных комплексов эритроцитов В(III) группы крови. Таким образом, полученные с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии электронные микрофотографии показывают, что пируват снижает степень сродства антигена к антителу у лиц В(III) группы крови, что выражается в уменьшении количества комплексов антиген–антитело, а этанол, наоборот, увеличивает число агглютинатов эритроцитов у лиц В(III) группы крови.

Количественную оценку действия пирувата и этанола на антиген–антительное взаимодействие проводили с помощью измерения интенсивности флуоресценции комплексов антигенов с антителами, меченными ФИТЦ. Диаграммы распределения интенсивности флуоресценции агглютинатов эритроцитов А(II) и В(III) групп крови до и после инкубации с пируватом и этанолом (раздельно) показаны на рисунках 11 и 12.

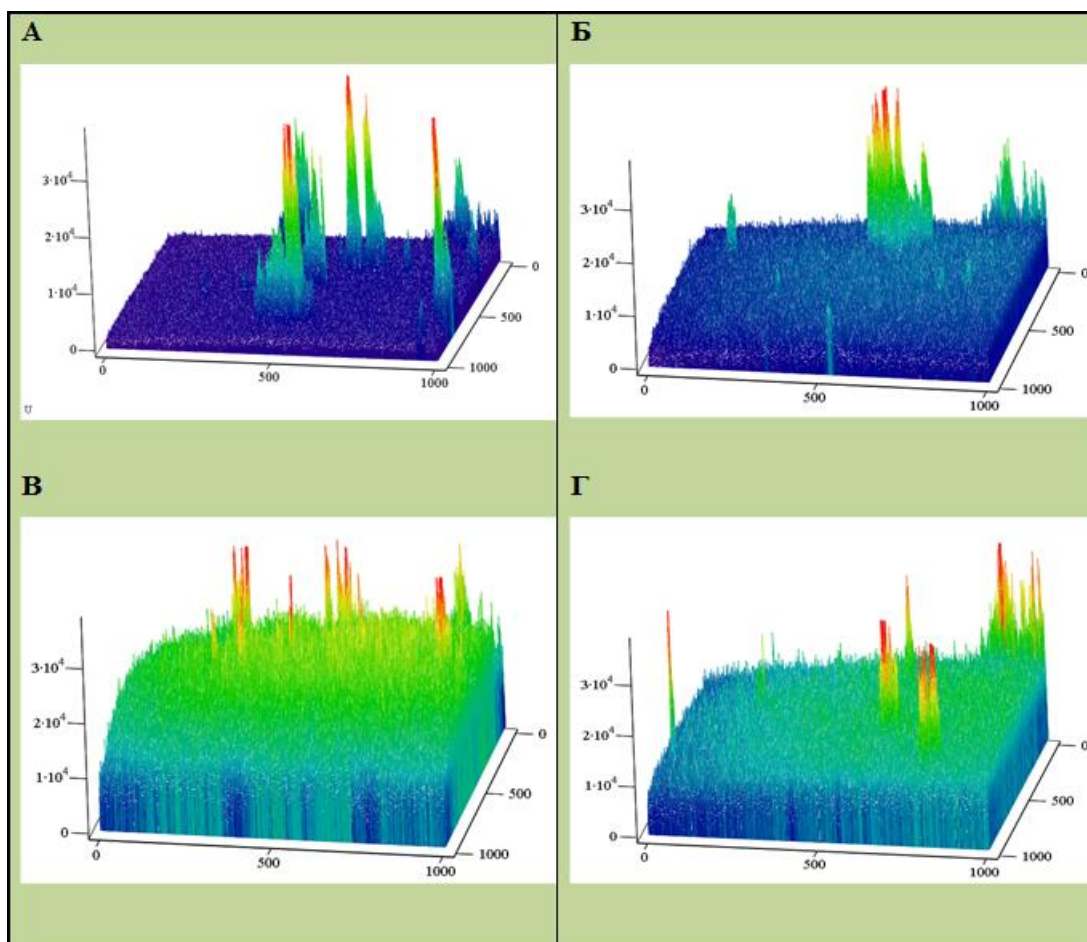


Рисунок 11. Диаграммы пространственного распределения интенсивности флуоресценции в комплексах антиген–антитело, полученные с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (оси x и y - размер в мкм, z – интенсивность флуоресценции в усл.ед.):

- А – эритроциты А(II) группы крови (контрольные образцы);
- Б – эритроциты А(II) группы крови после инкубации с пируватом;
- В – эритроциты В(III) группы крови (контрольные образцы);
- Г – эритроциты В(III) группы крови после инкубации с пируватом

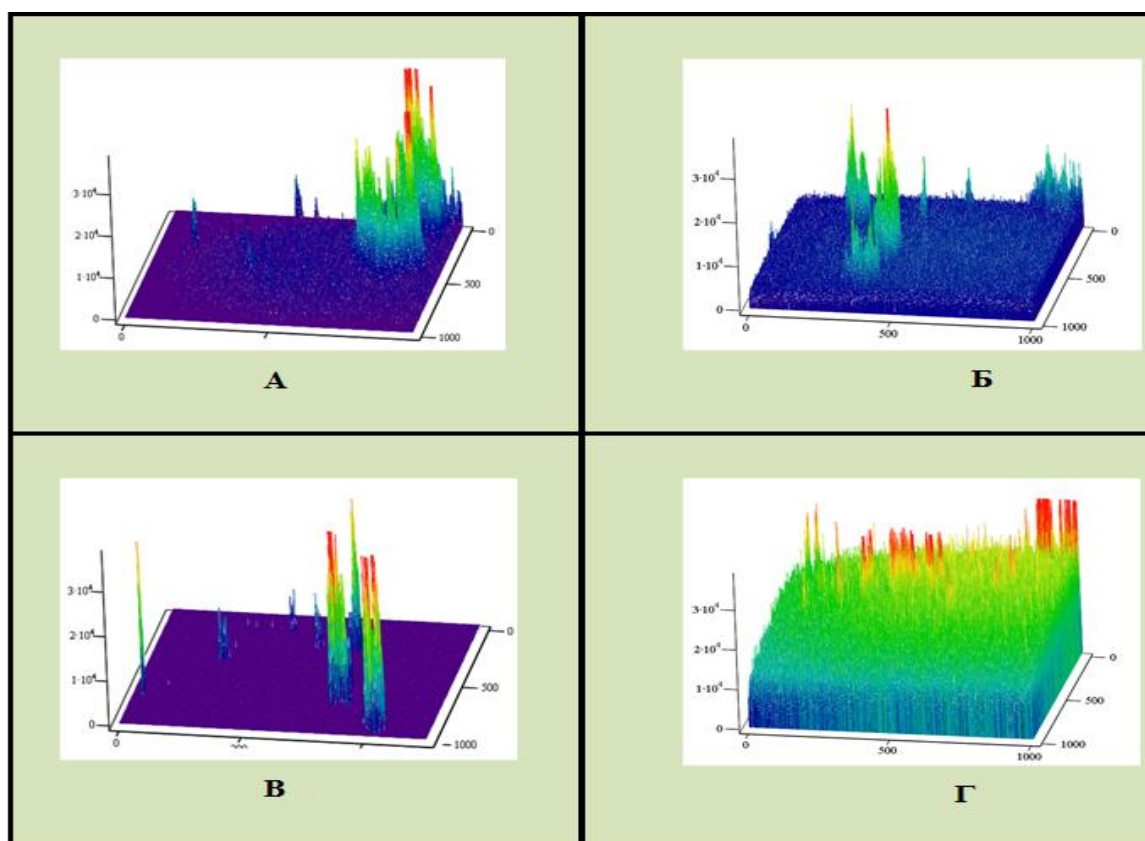


Рисунок 12. Диаграммы пространственного распределения интенсивности флуоресценции в комплексах антиген–антитело, полученные с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (оси x и y - размер в мкм, z – интенсивность флуоресценции в усл.ед.):

- А – эритроциты А(II) группы крови (контрольные образцы);
- Б – эритроциты А(II) группы крови после инкубации с этанолом;
- В – эритроциты В(III) группы крови (контрольные образцы);
- Г – эритроциты В(III) группы крови после инкубации с этанолом

Анализ результатов пространственного распределения интенсивности флуоресценции комплексов антиген–антитело эритроцитов А(II) и В(III) групп крови после инкубации с пируватом показал уменьшение интенсивности флуоресценции в образцах эритроцитов А(II) и В(III) групп крови на 5,3% и 16,7%, соответственно, и увеличение интенсивности флуоресценции комплексов антиген–антитело в образцах эритроцитов А(II) и В(III) групп крови после воздействия этанолом на 4,7% и 15%, соответственно. Достоверное снижение интенсивности флуоресценции наблюдалось только в образцах эритроцитов В(III) группы крови.

Антиген А демонстрирует толерантность к воздействию пирувата и этанола, а антиген В, наоборот – чувствителен к присутствию метаболитов в среде. Можно предположить, что пируват влияет на активные реакционноспособные группы антигена В, ответственные за связывание с моноклональными антителами, что отражается на изменении конформации белковой молекулы, а также способности

антигенов образовывать комплексы с антителами, снижая сродство между ними, тогда как этанол способствует узнаванию и связыванию эритроцитов В(III) группы крови с антителами.

Сравнительная оценка влияния пирувата и этанола на интенсивность флуоресценции комплексов антиген–антитело эритроцитов А(II) и В(III) групп крови представлена на рисунке 13.

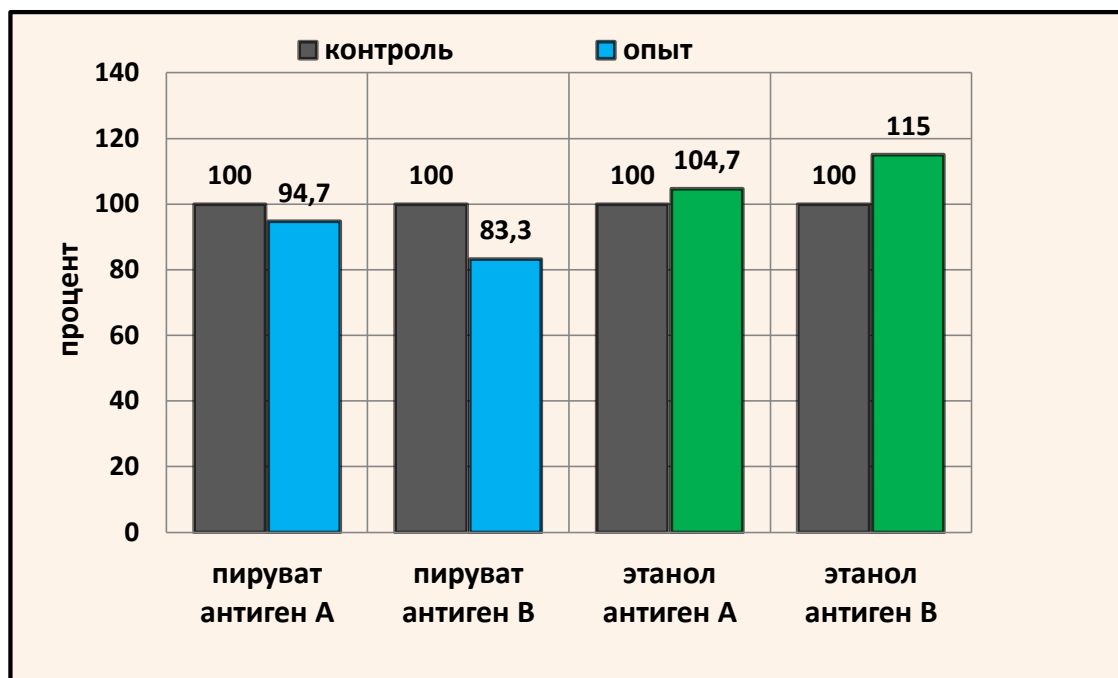


Рисунок 13. Сравнительная оценка влияния пирувата и этанола на интенсивность флуоресценции комплексов антиген–антитело эритроцитов А(II) и В(III) групп крови (за 100% принято значение интенсивности флуоресценции антиген–антительных комплексов эритроцитов А(II) и В(III) групп крови в контрольных образцах)

Методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии установлено, что пируват и этанол влияют на антиген–антительное взаимодействия системы АВ0 крови. Выявлена тенденция: пируват угнетает процесс образования комплексов антиген–антитело, а этанол, наоборот, стимулирует, т.е. метаболиты оказывают разнонаправленное действие на процесс агглютинации эритроцитов А(II) и В(III) групп крови.

Количественная оценка влияния пирувата на антиген–антительное взаимодействие методом проточной цитофлуориметрии. Следует отметить, что в литературе встречается немного сведений об использовании проточной цитофлуориметрии для оценки антиген–антительного взаимодействия системы АВ0 крови. Количественная оценка взаимодействия антиген–антитело эритроцитов А(II), В(III) и АВ(IV) групп крови под действием пирувата представлена в таблице 4.

Таблица 4. Интенсивность флуоресценции антиген–антительных комплексов эритроцитов А(II), В(III) АВ(IV) групп крови до и после действия пирувата (усл. ед).

Статистический показатель	Контроль антиген А А(II)	Опыт антиген А А(II)	Контроль антиген В В(III)	Опыт антиген В В(III)
M±SD	131,5±1,64	139,5±1,85	139,7±2,5	124±3,9
Me	131,7	139,1	140	123,9
Δ%	-	+6	-	-11
p		p>0,05		p<0,05
Статистический показатель	Контроль антиген А АВ(IV)	Опыт антиген А АВ(IV)	Контроль антиген В АВ(IV)	Опыт антиген В АВ(IV)
M±SD	163±2,7	139,5±1,7	136,5±1,8	133±1,9
Me	163	139,5	136,2	133,4
Δ%	-	-14	-	-3
p		p<0,01		p>0,05

Сравнивая между собой уровни интенсивности флуоресценции эритроцитов А(II), В(III) и АВ(IV) групп крови, установленные методом проточной цитофлуориметрии, следует отметить, что под влиянием пирувата достоверно снижалась интенсивность флуоресценции эритроцитов В(III) группы крови (p<0,05) и АВ(IV) группы крови в эксперименте с антигеном А (p<0,01).

Сравнительная оценка влияния пирувата на антиген–антительное взаимодействие эритроцитов А(II), В(III) и АВ(IV) групп крови представлена на рисунке 14.

Количественная оценка антиген–антительного взаимодействия антигенов А и В исследуемых групп крови после воздействия пирувата, полученная методом проточной цитофлуориметрии, подтверждает общую тенденцию: пируват способствует угнетению процесса агглютинации эритроцитов В(III) и АВ(IV) групп крови.

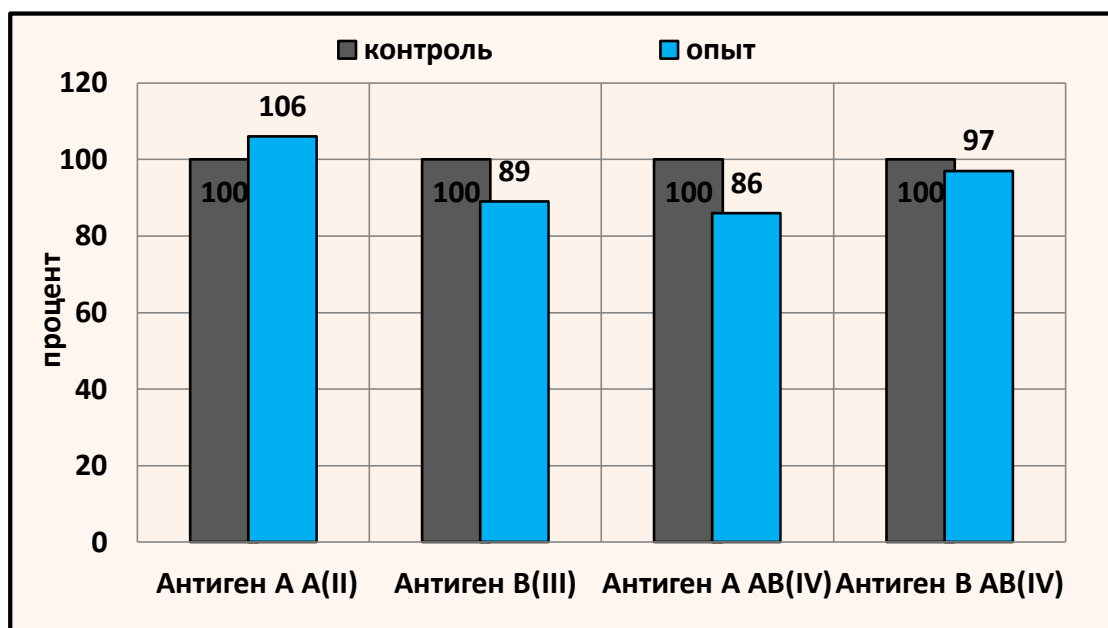


Рисунок 14. Сравнительная оценка влияния пирувата на антиген–антительные взаимодействия эритроцитов А(II), В(III) и АВ(IV) групп крови (за 100% принято значение интенсивности флуоресценции в контрольных эритроцитах А(II), В(III) и АВ(IV) групп крови, регистрируемое проточной цитофлуориметрией)

Нами впервые были использованы методы конфокальной лазерной сканирующей микроскопии и проточной цитофлуориметрии, а также модель антиген–антитело для оценки на молекулярном уровне влияния низкомолекулярных метаболитов на антиген–антительное взаимодействие, в зависимости от групповой принадлежности крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования системы АВ0 крови в качестве молекулярной модели для изучения межмолекулярных взаимодействий, а также о возможности использования естественных метаболитов, в частности пирувата, лактата и этанола, в качестве молекулярных зондов. Три серии модельных экспериментов, проведенных с антигенами А и В эритроцитов крови, естественными антителами системы АВ0 и моноклональными антителами, показали, что под влиянием этих эндогенных

метаболитов могут изменяться показатели агглютинации эритроцитов – степень агглютинации и время начала агглютинации эритроцитов.

Под воздействием пирувата и этанола наблюдался однонаправленный характер сдвига степени агглютинации эритроцитов крови, а именно – снижение, тогда как лактат не влиял на степень агглютинации эритроцитов. Выявлена определенная тенденция: пируват и лактат способствуют увеличению времени начала агглютинации антигенов А и В эритроцитов А(II), В(III) и АВ(IV) групп крови, а этанол, наоборот – снижению времени наступления агглютинации эритроцитов. Очевидно, что различия в структуре антигенных детерминант группоспецифических антигенов обуславливают определенный характер связывания с антителами, и даже небольшие изменения в окружающей среде могут оказывать влияние на антиген-антительное взаимодействие.

Установлено модифицирующее влияние пирувата, лактата и этанола на иммуноглобулины плазмы крови системы АВ0. Степень агглютинации анти-А и анти-В антител плазмы с антигенами эритроцитов под влиянием пирувата и этанола увеличивалась, а под действием лактата, наоборот, уменьшалась.

Показано, что моноклональные антитела служат объектом прямого или опосредованного действия исследуемых низкомолекулярных метаболитов. Степень агглютинации моноклональных антител с антигенами эритроцитов всех исследуемых групп крови под влиянием лактата снижалась. Выявлена отчетливая тенденция: присутствие в среде пирувата и этанола способствовало снижению времени наступления агглютинации анти-А и анти-В моноклональных антител с эритроцитами А(II) и В(III) групп крови и увеличению – с эритроцитами АВ(IV) группы крови. Лактат существенно удлинял время начала образования агглютинатов эритроцитов А(II), В(III) и АВ(IV) групп крови.

Показано активирующее влияние этанола на фермент-субстратные взаимодействия дегидрогеназ. При этом увеличение активности ГАФД, α-ГФД и ЛДГ после инкубации с этанолом в гемолизате крови было выражено сильнее, чем в изолированной среде (чистые ферментные препараты).

С помощью программы PASS, основанной на анализе взаимосвязей «структура–активность», предсказаны многопрофильные и разнообразные биологические эффекты низкомолекулярных лигандов: пирувата, лактата и этанола, а также антигенных детерминант антигенов А и В системы АВ0 крови. Полученные результаты молекулярного моделирования показывают потенциальные возможности указанных соединений влиять на межмолекулярные процессы, изменять метаболизм и функции клеток, участвовать в регуляции обмена веществ и поддерживать метаболический баланс.

Визуализация комплексов антиген–антитело дала возможность оценить особенности действия биологически активных метаболитов в зависимости от групповой принадлежности крови индивидуумов. Использование эндогенных метаболитов в качестве молекулярных зондов позволило выяснить биологические эффекты данных соединений и особенности их влияния на белок-лигандные взаимодействия.

Количественная оценка интенсивности флуоресценции эритроцитов А(II) и В(III) групп крови методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии продемонстрировала угнетение процесса агглютинации эритроцитов крови под влиянием пирувата и, напротив, его стимуляцию под действием этанола, что совпадает с результатами, полученными с помощью иммунологического исследования (реакция гемагглютинации). Оценка антиген–антительного взаимодействия эритроцитов исследуемых групп крови методом проточной цитофлуориметрии, подтверждает общую тенденцию: пируват способствует угнетению процесса агглютинации эритроцитов В(III) и АВ(IV) групп крови. При этом пируват и этанол сильнее влияют на специфичность эпитоп–паратоп взаимодействия антигена В. Весьма вероятно, что в основе неоднотипной тенденции выявленных сдвигов лежат различия в строении антигенных детерминант антигенов А и В, обладающих различным химическим строением.

Полученные результаты дают новый фактический материал, характеризующий особенности белок-лигандного взаимодействия, лежащие в основе способности антигенов, антител и ферментов взаимодействовать с различными лигандами.

Становится все более очевидным, что в регуляции обменных процессов значительную роль играют низкомолекулярные соединения, в частности метаболиты, способные влиять на белок-белковые и белок-лигандные взаимодействия в клетках и биологических жидкостях. Необходимы дальнейшие исследования молекулярных механизмов этих межмолекулярных взаимодействий, которые позволят выяснить их характер и специфичность.

По результатам проведенного исследования сделаны следующие **выводы**:

1. Разработана модельная система для оценки действия биологически активных веществ на антиген–антительное взаимодействие системы АВ0 крови.

2. На примере действия пирувата и этанола на взаимодействие антиген–антитело системы АВ0 крови выявлено снижение степени агглютинации антигенов А и В эритроцитов различных групп крови. Показано, что все три метаболита могут модулировать время начала агглютинации группоспецифических антигенов эритроцитов, которое увеличивалось под действием пирувата и лактата и уменьшалось под влиянием этанола.

3. Выявлено разнонаправленное изменение степени агглютинации анти-А и анти-В антител плазмы крови с антигенами эритроцитов под влиянием всех трех изучаемых метаболитов. Степень агглютинации анти-А и анти-В моноклональных антител с эритроцитами А(II), В(III) и АВ(IV) групп крови не изменялась под влиянием пирувата и этанола и снижалась на 75% под действием лактата. Установлено разнонаправленное действие метаболитов на время начала агглютинации анти-А и анти-В моноклональных антител с эритроцитами разных групп крови. Лактат увеличивал в 15-20 раз время начала агглютинации моноклональных антител с антигенами эритроцитов всех исследуемых групп крови.

4. Установлено, что этанол может регулировать фермент-субстратные взаимодействия дегидрогеназ: глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, α-глицеролфосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы. Увеличение активности исследуемых ферментов под влиянием этанола в гемолизате цельной крови было в 2,5–3 раза выше, чем в изолированной среде (с чистыми препаратами ферментов).

5. Охарактеризован спектр вероятной биологической активности пирувата, лактата, этанола и антигенных детерминант антигенов А и В системы АВ0 крови методом молекулярного моделирования. Благодаря многообразию проявляемых биологических эффектов антигенные детерминанты А и В открываются с новой перспективной стороны как биологически активные соединения, а не только как группоспецифические антигены.

6. Наглядно продемонстрировано с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, что под влиянием пирувата и этанола изменялись размер и количество комплексов антиген–антитело эритроцитов различных групп крови системы АВ0. Осуществлена количественная оценка антиген–антительного взаимодействия в присутствии в среде пирувата и этанола.

7. Оценка взаимодействия антиген–антитело в условиях действия пирувата методом проточной цитофлуориметрии показала, что количество образующихся иммунных комплексов уменьшалось в образцах В(III) и АВ (IV) групп крови.

8. Групповая принадлежность крови системы АВ0 определяет специфичность ответа антигенов эритроцитов и антител к ним на действие эндогенных метаболитов, формируя индивидуальные особенности организма.

На основе полученных результатов даны следующие **практические рекомендации:**

1. Модель антиген–антительного взаимодействия может быть применена для тестирования биологической и фармакологической активности соединений биогенного характера, а также ксенобиотиков (Патент на изобретение № 2484480 «Способ оценки действия биологически активных веществ на антиген–антительное взаимодействие» от 10 июня 2013 г.)

2. При постановке чувствительных современных методов лабораторных исследований – иммуноферментного, иммунофлуоресцентного анализов и проточной цитофлуориметрии необходимо учитывать повышение концентрации метаболитов в сыворотке крови, которое может повлиять на результаты определений.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Патент на изобретение РФ № 2484480 от 10. 06. 2013г. «Способ оценки действия биологически активных веществ на антиген-антительное взаимодействие». Гильмиярова Ф.Н., Радомская В.М., Шахнович Е.А., Рыскина Е.А., Колотьева Н.А., Нефедова Н.С.

Публикации в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК:

2. **Ryskina E.A.**, Gilmiyarova F.N., Baisheva G.M., Lobaeva T.A. Effect of ethanol on the enzyme-substrate interaction dehydrogenases. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2016. V. 7. Issue 6. P. 3137-3141.
3. Гильмиярова Ф.Н., Радомская В.М., **Рыскина Е.А.**, Нефедова Н.С., Баишева Г.М., Первова Ю.В. и др. Влияние этанола на белок-белковые взаимодействия. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2015. № 4. С. 20-25.
4. Гильмиярова Ф.Н., Радомская В.М., Гусякова О.А., **Рыскина Е.А.** и др. Влияние пирувата на взаимодействие антител с группоспецифическими антигенами эритроцитов. Биомедицинская химия. 2015. Т. 61. № 1. С. 132-140.
5. Гильмиярова Ф.Н., Колотьева Н.А., **Рыскина Е.А.**, Радомская В.М., Гусякова О.А., Потехина В.И., Горбачева И.В. Структурно-регуляторный потенциал лактата. Электронный журнал «Современные проблемы науки и образования». 2016. №2. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24263>.
6. **Рыскина Е.А.**, Гильмиярова Ф.Н. Групповые антигены различных животных. Вестник РУДН, серия «Агрономия и животноводство». 2015. № 1. С. 25-34.
7. **Рыскина Е.А.** Полифункциональность пирувата. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2014. № 10. С. 42-47.
8. Gylmiyarova F.N., Radomskaaya V.M., Gusyakova O.A., **Ryskina E.A.**, Kolotyeva N.A. et.al. The Effect of Pyruvate on Antibody Interaction with Group Specific Erythrocyte Antigens. Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2014. Vol. 8. С. 260-266.
9. Гильмиярова Ф.Н., Колотьева Н.А., Шахнович Е.А., Мякишева Ю.В., **Рыскина Е.А.** и др. Антигены АВ0 системы. Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. 2013. №8. С. 21 – 28.
10. Гильмиярова Ф.Н., Радомская В.М., **Рыскина Е.А.**, Гусякова О.А. Колотьева Н.А., Шахнович Е.А., Нефедова Н.С., Чудинова А.А. Минорные компоненты метаболизма в регуляции белок-белковых взаимодействий. Медицинский альманах. 2013. № 2(26). С. 181 – 184.
11. Гильмиярова Ф.Н., Радомская В.М. **Рыскина Е.А.**, Бортникова Н.А., Гамзова Е.А., Епифанова А.А. Отличительные признаки антигенов АВ0 – основы индивидуального ответа на различные стимулы. Клиническая лабораторная диагностика. Москва. 2011. № 10. С. 3 – 4.
12. **Рыскина Е.А.**, Чернов Н.Н., Епифанова А.А., Нефедова Н.С. Полиморфизм и полифункциональность антигенов АВ0 системы крови. Вестник РУДН, серия «Медицина». Москва. № 4. - 2011. С. 31 – 36.
13. Гильмиярова Ф.Н., Радомская В.М., Гильмияров Э.М., Зубова И.А., **Рыскина Е.А.**, Епифанова А.А. Фенотипические особенности показателей гуморального иммунитета больных хроническим генерализованным пародонтитом

с различной группой крови. Биомедицинская химия. Москва. 2011. Т.57. №6. С. 650-656.

14. Гильмиярова Ф.Н., Радомская В.М., Гусякова О.А., Сидорова И.Ф., Зубова И.А., **Рыскина Е.А.** и др. Влияние малых молекул на процессы межмолекулярного взаимодействия, лежащие в основе лигандных технологий лабораторной диагностики. Клиническая лабораторная диагностика. Москва. 2010. №7. С. 14 - 18.

15. Гильмиярова Ф.Н., Радомская В.М., Гусякова О.А., Зубова И.Ф., Сидорова И.Ф., Карсян Л.С., Евсеева Т.Ю., Воронкова Е.Е., Мурский О.М., Габрильчак А.И., **Рыскина Е.А.** и др. Биологическая вариабельность метаболизма, связанная с АВ0-принадлежностью. Клиническая лабораторная диагностика. 2009. №11. С. 28 - 32.

16. Гусякова О.А., Зубова И.Ф., Сидорова И.А., **Рыскина Е.А.** и др. Молекулярные признаки АВ0 принадлежности в обеспечении специфики ответной реакции на биологически активные вещества. Вестник РУДН, серия «Медицина». 2009. № 3. С. 28-33.

17. Гильмиярова Ф.Н., Спиридонова Н.В., Мякишева Ю.В., Э.М. Гильмияров Э.М., **Рыскина Е.А.**, Павлова И.О. Ротовая жидкость: показатели метаболизма при различной групповой принадлежности крови. Клиническая лабораторная диагностика. 2007. № 9. С. 60-61.

Статьи и тезисы в научных журналах, сборниках трудов, материалы конференций и съездов:

18. **Ryskina E.A.**, Kolotyeva N.A., Gilmiyarova F.N., Chernov N.N. Intermolecular interaction of proteins and small molecules. European journal of natural history. 2016. № 3. P. 8-13.

19. Колотьева Н.А., Гильмиярова Ф.Н., Тимченко П.Е., Тимченко Е.В., **Рыскина Е.А.** Визуализация антиген-антительного взаимодействия с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Электронный журнал «Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований». 2016. Выпуск №8 (часть 5). С. 713-718; URL: <http://www.applied-research.ru/ru/article/view?id=10154>.

20. **Рыскина Е.А.**, Гильмиярова Ф.Н., Чернов Н.Н. Роль низкомолекулярных компонентов метаболизма в регуляции межмолекулярного взаимодействия. Научные труды V съезда физиологов СНГ и V съезда биохимиков России, конференции ADFLIM. Acta Naturae. Спецвыпуск. 2016. Т. 2. С. 45.

21. Гильмиярова Ф.Н., Радомская В.М., **Рыскина Е.А.**, Колотьева Н.А., Баишева Г.М., Первова Ю.В. Роль естественных интермедиатов в межмолекулярном взаимодействии белковых структур. Научные труды V съезда физиологов СНГ и V съезда биохимиков России, конференции ADFLIM. Acta Naturae. Спецвыпуск. 2016. Т. 2. С. 105.

22. Гильмиярова Ф.Н., Радомская В.М., **Рыскина Е.А.**, Колотьева Н.А., Баишева Г.М., Первова Ю.В. Прогнозируемые и экспериментально подтвержденные особенности гликопротеинов А и В системы крови АВ0 в формировании вариабельности метаболизма. Материалы всероссийской научно-практической конференции «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева. Рязань. 2016. С. 115-118.

23. Гильмиярова Ф.Н., Радомская В.М., **Рыскина Е.А.**, Колотьева Н.А., Балдина О.А. и др. Интермедиаты в регуляции межмолекулярного взаимодействия в лигандных технологиях. Лаборатория. 2016. №1. С. 11-12.

24. Гильмиярова Ф.Н., **Рыскина Е.А.**, Радомская В.М., Горбачева И.В. Метаболическое зондирование минорными компонентами обмена процессов межмолекулярного взаимодействия. Сборник научных статей российской научно-практической конференции «Медицинская биохимия: достижения и перспективы». Казань. Издательство «Бриг». 2015. С. 35-41.

25. Gylmiyarova F.N., Radomskaaya V.M., Babichev A.V., Shakhnovich E.A., **Ryskina E.A.** et.al. Biologically active components of silibum marianum fruits have potential for health improving innovations in attractive and sustainable food for health. 28th EFFoST International Conference. 7th International Food Factory for the Future Conference. 2014. Sweden (Uppsala). P 1.054.

26. Гусякова О.А., Гильмиярова Ф.Н., **Рыскина Е.А.**, Горбачева И.В. Естественные метаболиты как лиганды межмолекулярных взаимодействий, лежащие в основе лабораторных технологий. Всероссийская научная конференция «Медицинская лабораторная диагностика: будущее и новации». Санкт-Петербург. 2014. С. 36-37.

27. Гильмиярова Ф.Н., Шахнович Е.А., Радомская В.М., Гусякова О.А., **Рыскина Е.А.**, И.В. Горбачева. Система АВ0 как критерий персонализации фармакотерапии. Сборник трудов IV Международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Казань. 2014. С. 254. (S08-08).

28. Гильмиярова Ф.Н., Колотьева Н.А., Шахнович Е.А., Мякишева Ю.В., **Рыскина Е.А.** и др. Белок-белковые взаимодействия в присутствии минорных компонентов метаболизма. Сборник тезисов III Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Казань. 2012. С. 152.

29. Гильмиярова В.М. Радомская В.М., Гусякова О.А., Епифанова А.А., **Рыскина Е.А.** и др. И.Ф. Оценка полиморфизма АВ0 и резус-систем крови доноров. Материалы XVI Международной научной конференции «Здоровье семьи в XXI веке». Будапешт (Венгрия). 2012. С. 70-72.

30. Гильмиярова, Ф.Н. Радомская В.М., Шахнович Е.А., Нефедова Н.С., Колотьева Н.А., **Рыскина Е.А.**, Епифанова А.А. Метаболический профиль 0(I) – АВ(IV) групп крови. Медицинский альманах. Н. Новгород. 2012. № 1 (20). С.174 – 178.

31. Колотьева, Н.А. Шахнович Е.А., Нефедова Н.С., Кобозева Е.И., Волков Е.Д., **Рыскина Е.А.** Роль малых молекул в реализации белок-белковых

взаимодействий. Сборник трудов II Международной Интернет-конференции «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии: сборник трудов». Казань. 2011. С. 152-153.

32. Гильмиярова Ф.Н., **Рыскина Е.А.**, Радомская В.М., Бортникова Н.А., Гамзова Е.А., Епифанова А.А., Мякишева Ю.В. Метаболическое зондирование и компьютерное моделирование в изучении структурно - функциональных особенностей антигенов H, A, B. Материалы Всероссийской научно-практической конференции биохимиков и специалистов по лабораторной медицине. Омск. 2011. С. 74 – 75.

33. Гильмиярова Ф.Н., Радомская В.М., Колотьева Н.А., Шахнович Е.А., Нефедова Н.С., **Рыскина Е.А.** и др. Прогнозируемая биологическая активность антигенных детерминант АВ0 системы крови. Альманах «Жизнь плюс наука». Самара: ООО «Книга». 2011. Вып. 7. С. 24-27.

34. Колотьева Н.А., Шахнович Е.А., Нефедова Н.С., **Рыскина Е.А.**, Епифанова А.А., Колесова, К.И., Долгова О.А. Модифицирующее влияние малых молекул на белок-лигандное взаимодействие. Сборник тезисов II Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Новосибирск. 2011. С. 211.

35. Гильмиярова Ф.Н., Радомская В.М., Гусякова О.А., Зубова И.Ф., Бабичев А.В., Кузнецова О.Ю., Виноградова Л.Н., Гергель Н.И., Сидорова И.Ф., Сазонова О.В., **Рыскина Е.А.** и др. Фундаментальные исследования молекулярных признаков АВ0 – принадлежности, реализованных в показателях метаболизма и клеточного состава крови в норме и патологии. Сборник трудов Российской конференции, посвященной 80 – летию со дня рождения Р.И. Лившица «Актуальные проблемы теоретической и прикладной биохимии». Челябинск. 2009. С. 27 – 29.

36. Гильмиярова Ф.Н., Мякишева Ю.В., **Рыскина Е.А.** и др. Особенности метаболического и клеточного состава крови, ассоциированные с групповой принадлежностью в системе АВ0, в норме и патологии. Астраханский медицинский журнал. 2008. Т. 3, № 3. С. 76-79.

37. Гильмиярова Ф.Н., Виноградова Л.Н., Нуретдинова С.Р., **Рыскина Е.А.** Метаболические особенности, ассоциированные с групповой принадлежностью крови как предрасположенность развития остеопороза. Материалы VIII Российского съезда травматологов-ортопедов «Травматология и ортопедия XXI века». Самара. 2006. С. 37-38.

38. **Рыскина Е.А.** Практические аспекты внутрилабораторного контроля качества. Материалы межрегиональной научно-практической конференции биохимиков Урала, Поволжья и Западной Сибири «Новая идеология в единстве фундаментальной и клинической медицины». Самара. 2005. С. 330-336.

Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ

39. Программа для обработки данных биохимического, гематологического, иммунологического, гемостазиологического анализа крови человека. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ № 2009613356 от 26.06.2009. О.А. Гусякова И.А., Зубова И.Ф., Сидорова С.И., Мурский О.М., **Рыскина Е.А.**, Родькина О.М. и др.

40. Программа для импорта данных, полученных с биохимического анализатора COBAS INTEGRA 400 Plus. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ № 2009617397 от 17.02.2010 г. Мурский С.И., Гусякова О.А., Зубова И.А., Воронкова Е.Е., Липатова Е.С., **Рыскина Е.А.** др.

Рыскина Елена Анатольевна
«Особенности влияния низкомолекулярных метаболитов на взаимодействие белков с лигандами»

Разработана новая модельная система, представленная антигенами и антителами системы АВ0 крови. Получены экспериментальные данные, свидетельствующие о модификации взаимодействий антигена с антителом в присутствии пирувата, лактата и этанола, что приводит к регистрируемому изменению степени и скорости агглютинации группоспецифических антигенов эритроцитов с антителами. Выявлено, что этанол увеличивал активность дегидрогеназ: глицераальдегидфосфатдегидрогеназы, α -глицеролфосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы как в гемолизате цельной крови, так и в изолированной среде (чистые препараты ферментов). Впервые методом молекулярного моделирования, с использованием программы Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS), предсказаны многопрофильные и разнообразные фармакологические эффекты и молекулярные механизмы действия пирувата, лактата и этанола, а также антигенных детерминант антигенов А и В системы АВ0. Визуализация комплексов антиген–антитело с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии и проточной цитофлуориметрии дала возможность оценить особенности действия биологически активных метаболитов в зависимости от групповой принадлежности крови индивидуумов.

Ryskina Elena Anatol'evna
“Special aspects of influence of low-molecular metabolites on protein-ligand interactions”

A novel model system based on the antigens and antibodies of the АВ0 blood system has been developed. Experimental data indicate alterations in the antigen-antibody interactions in the presence of pyruvate, lactate, and ethanol, resulting in detectable changes in the extent and the rate of agglutination of the erythrocyte group-specific antigens with the antibodies. Ethanol was shown to increase the activity of dehydrogenases (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, α -glycerolphosphate dehydrogenase, and lactate dehydrogenase) both in the blood hemolysate and in systems containing the purified enzymes. Molecular simulation with the program Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS) allowed prediction of diverse pharmacological effects and molecular mechanisms of action of pyruvate, lactate, ethanol and antigen determinants of the antigens А and В of the АВ0 system. Visualization of the antigen-antibody complexes using confocal laser scanning microscopy together with flow cytofluorometric analysis allowed characterization of action of biologically active metabolites depending the blood-group specificity of an individuum.

РЫСКИНА ЕЛЕНА АНАТОЛЬЕВНА

**ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТАБОЛИТОВ НА
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ С ЛИГАНДАМИ**

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук**