

СТРУКТУРНО-РЕГУЛЯТОРНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ЛАКТАТА

Гильмиярова Ф. Н.¹, Колотьева Н. А.¹, Рыскина Е. А.², Радомская В. М.¹,
Гусякова О. А.¹, Потехина В. И.¹, Горбачева И. В.¹

¹ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара, e-mail: bio-sam@yandex.ru;

²ФГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов», Москва

В последнее десятилетие изучение взаимодействий белка с малыми молекулами и метаболитами было запаздывающим по сравнению с изучением других типов взаимодействий, таких как белок-белковое, белок-ДНК и белок-РНК. На новом этапе изучения проблемы, благодаря научным и технологическим достижениям, мы начали исследовать влияние малых молекул на межмолекулярные взаимодействия. Получили новые данные, которые вносят вклад в понимание межклеточного взаимодействия. В прикладном отношении определяют необходимость учитывать в практике работы клинико-диагностической лаборатории отклонения в фонде метаболома, которые особенно значимы для иммуноферментных исследований. На протяжении длительного времени изучения истории метаболизма лактат был рассмотрен лишь как тупиковый метаболит анаэробного катаболизма глюкозы. Его колебание в жидких средах организма типично для многих синдромов. Заряд и кислые свойства – реальный фактор воздействия на структуру и функцию различных белков. Актуальным является изучение роли лактата – одного из естественных интермедиатов, в процессах белок-лигандного взаимодействия. С этой целью применяется молекулярное моделирование и метаболическое зондирование с использованием биогенных молекул низкой молекулярной массы. Полученные результаты методом компьютерного прогнозирования выявили вероятность влияния лактата на межмолекулярные процессы путем воздействия на белковый, углеводный, липидный обмен, антиоксидантные процессы, тканевое дыхание. Серия проведенных экспериментов отчетливо показала активное влияние лактата на белок-лигандные взаимодействия антигена с антителом АВ0-системы, что является результатом суммарных модификаций, вызванных этим метаболитом. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования естественных интермедиатов, в частности, лактата, молекулярного зонда и перспективности использования гликопротеинов А и В, презентированных на мембране эритроцитов, в качестве молекулярной модели для изучения межмолекулярных взаимодействий.

Ключевые слова: лактат, молекулярное моделирование, межмолекулярное взаимодействие, PASS, гликопротеины А и В, естественные и моноклональные антитела.

STRUCTURAL AND REGULATORY POTENTIAL OF THE LACTATE

Gilmiyarova F. N.¹, Kolotyeva N. A.¹, Ryskina E. A.², Radomskaya V. M.¹,
Gusyakova O. A.¹, Potekhina V. I.¹, Gorbacheva I. V.¹

¹Samara State Medical University, Samara, e-mail: bio-sam@yandex.ru;

²Peoples' Friendship University of Russia, Moscow

In the last decade the study of protein interactions with small molecules and metabolites was delayed in comparison with the study of other types of interactions such as protein-protein, protein-DNA and protein-RNA. Due to scientific and technological achievements now we are standing on the new stage of this problem and starting to investigate the effect of small molecules on intermolecular interactions. New data contributing to better understanding intercellular interactions were received. For a long time the study of the lactate metabolism was considered only as a dead-end metabolite of anaerobic catabolism of glucose. The increased level of lactate in different tissues of the organism is a typical syndrome for many disease. Ionic charge and acidic properties are the two main factors of influencing the structure and function of different proteins. This research is aim to study the role of lactate – one of the natural intermediates in the processes of protein-ligand interactions. To study these processes molecular modeling and metabolic sensing using a biogenic molecules of low molecular weight are used. The results obtained by computer prediction revealed the possible impact of lactate on intermolecular processes by affecting protein, carbohydrate and lipid metabolism, antioxidant processes, tissue respiration. A series of experiments definitely showed the active influence of lactate on protein-ligand interactions of the antigen with the АВ0-system antibody that is the result of cumulative modifications caused by this metabolite. The results indicate the possibility of using natural intermediates as a molecular probe, lactate in particular, and the opportunity of using glycoproteins А and В which are located on the membrane of red blood cells, as a molecular model for the study of intermolecular interactions.

Keywords: lactate, molecular modeling, intermolecular interaction, PASS, glycoproteins A and B, natural and monoclonal antibodies.

В настоящее время существует потребность в фундаментальных исследованиях, раскрывающих молекулярные механизмы основных процессов жизнедеятельности, ключевыми из которых являются межмолекулярные взаимодействия. Клеточная сигнализация является решающей практически во всех основных биологических процессах, в частности, проводником между компонентами клетки для поддержания процессов синтеза и распада, трансдукции сигнала, инициации репликации ДНК, транскрипции, трансляции, пролиферации, дифференцировки и адаптации, что определяет актуальность изучения. В то время как многие биохимические взаимодействия ранее были представлены как реакция между белком, ферментом и их субстратами и продуктами, нам известно очень мало о том, как малые молекулы и естественные метаболиты на системном уровне регулируют функции белка. В последнее десятилетие изучение взаимодействий белка с малыми молекулами, в частности, метаболитами было запаздывающим по сравнению с изучением других типов взаимодействий, таких как белок-белковое, белок-ДНК и белок-РНК [7]. На новом этапе изучения проблемы, благодаря научным и технологическим достижениям, мы начали изучать влияние малых молекул на межмолекулярные взаимодействия и получили новые данные, имеющие важное значение в нашем понимании межклеточного взаимодействия. В прикладном отношении в практике клинико-диагностической лаборатории учитывать отклонения в фонде метаболома [1, 6]. На протяжении длительного времени изучения истории метаболизма лактат был рассмотрен лишь как тупиковый метаболит анаэробного катаболизма глюкозы [10]. Однако его колебание в жидких средах организма типично для многих синдромов. Заряд и кислые свойства этого соединения – фактор воздействия на структуру и функцию белков. Актуальным является изучение роли естественных интермедиатов в процессах белок-лигандного взаимодействия. С этой целью применяется молекулярное моделирование и метаболическое зондирование с использованием биогенных молекул низкой молекулярной массы.

Материалы и методы

Метод компьютерного моделирования PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) представляет собой компьютерную программу, позволяющую прогнозировать большое число вероятных видов биологической активности вещества на основе его структурной формулы с использованием единого описания химической структуры и универсального математического алгоритма установления зависимостей «структура-активность». Спектр биологической активности описывается качественным образом: оценивается вероятность наличия (P_a) и вероятность отсутствия (P_i) каждой активности,

имеющие значения от 0 до 1. Оптимальным значением вероятности наличия активности мы приняли P_a более 0,5 [3, 9].

Объектом исследования являлась молекулярная модель АВ0 системы с последующим изучением влияния малой молекулы лактата на антиген-антительное взаимодействие (патент на изобретение №2484480 от 10.06.2013) [4]. Определение группы крови системы АВ0 проводилось с использованием моноклональных антител Анти-А, Анти-В методом прямой агглютинации на плоскости с балльной оценкой интенсивности агглютинации по W. Marsh [8], а также на автоматическом анализаторе для проведения иммуногематологических исследований «Хемос СП II» фирмы BIO-Rad. В качестве контроля брали среднее значение времени (в секундах) и степени агглютинации антигенов А и В (по шкале) II, III, IV групп крови с моноклональными антителами. Для изучения биологического действия малых молекул на агглютиногены А, В, изоагглютинины анти-А и анти-В группы крови по системе АВ0 и моноклональные антитела анти-А и анти-В перед постановкой реакции гемагглютинации эритроциты инкубировали с раствором лактата.

Статистический анализ данных проводили в среде статистического пакета прикладных программ SPSS 12.0 и в программе MS EXCEL 2007. Полученные данные были описаны с использованием таких статистических характеристик, как медиана (Me), средняя арифметическая (M), стандартная ошибка от средней арифметической (m), максимум и минимум, 95 % интервал. Для оценки формы распределения исследуемых показателей использовался графический метод (визуальная оценка гистограмм распределения), оценивались показатели скошенности и крутизны, отражающие асимметрию распределения, тесты на нормальность с помощью критерия Колмогорова – Смирнова с поправкой Лиллиефорса и Шапиро – Уилки. Для показателей, имеющих значительные выбросы, при которых некорректно применять классический ANOVA, использовался тест Манна – Уитни (для парных сравнений) с поправкой Бонферони. Критическое значение уровня значимости принимали равным 0,05.

Результаты и их обсуждение

Анализ результатов молекулярного моделирования показал, что у лактата существует вероятность наличия 318 фармакологических эффектов из 501 возможных, 2108 механизмов их реализации из 3295. Выявлено 52 из 57 возможных побочных и токсических эффектов, 177 метаболически опосредованных действий. Нами отмечены 863 биологических эффекта: 52 фармакологических, 756 молекулярных механизмов действия, 25 возможных токсических эффектов и 30 метаболически опосредованных действий (рис. 1 и таблица).



Рис. 1. Спектр прогнозируемых биологических эффектов лактата

Обращает на себя внимание наличие способности у лактата проявлять антацидное действие (Pa 0,932), влиять на процессы созревания клеток: стимулировать лейкопоз (Pa 0,803) и эритропоз (Pa 0,673), оказывать иммуномодулирующее (Pa 0,811), противовоспалительное (Pa 0,614), противовирусное влияние в отношении арбовирусов (Pa 0,753), риновирусов (Pa 0,623), пикорнавирусов (Pa 0,558) и папилломавирусов (Pa 0,542). Противовирусная активность лактата предположительно связана с pH-зависимыми перестройками в структуре вируса: при уменьшении pH среды вирус теряет инфекционную активность, при этом связь рибонуклеопротеина с белковым матриксом возрастает, что препятствует процессу репликации [2]. Интересными представляются данные о способности лактата оказывать защитное действие на мембраны клеток организма (Pa 0,544) и кровеносные сосуды (Pa 0,681). Вероятно, реализация данного эффекта возможна путем непосредственного влияния на нейрогенный тонус кровеносных сосудов [5]. Указывается способность лактата проявлять фибринолитическое (Pa 0,716), антитоксическое (Pa 0,559) действия. Возможность лактата оказывать такие биологические эффекты, предположительно, связана с имеющейся в составе гидроксильной группой, выполняющей роль заместителя и обуславливающей способность вступления соединения в реакции нуклеофильного замещения.

Принимая во внимание вышеописанные биологические эффекты лактата, следующей задачей было поставлено изучение молекулярной основы их реализации. Перечень молекулярных механизмов действия лактата представлен в таблице.

Возможные молекулярные механизмы действия лактата

Молекулярный механизм действия	Шифр фермента	Pa	Pi
Ингибитор лактат-2-монооксигеназы	EC 1.13.12.4	0,935	0,001
Ингибитор фосфоенолпируват фосфотрансферазы	EC 2.7.3.9	0,922	0,001
Ингибитор 1,4-лактоназы	EC 3.1.1.25	0,921	0,002
Ингибитор нуклеозид-трифосфотазы	EC 3.6.1.15	0,922	0,008
Ингибитор IgA-специфичной металлоэндопептидазы	EC 3.4.24.13	0,898	0,003
Ингибитор L-лактатдегидрогеназы	EC 1.1.2.3	0,892	0,001
Ингибитор пируватдегидрогеназы	EC 1.2.4.1	0,892	0,002
Ингибитор серин-3-дегидрогеназы	EC 1.1.1.276	0,886	0,001
Ингибитор глюкозооксидазы	EC 1.1.3.4	0,889	0,006
Ингибитор НАДФ-Н метилентетрогидрофолатредуктазы	EC 1.5.1.20	0,884	0,011
Ингибитор ацилглицероллипазы	EC 3.1.1.23	0,866	0,004
Ингибитор НАДН цитохром С редуктазы	EC 1.6.2.5	0,862	0,004
Ингибитор аланинтрансаминазы	EC 2.6.1.2	0,83	0,003
Ингибитор Ацил-КоА синтазы	EC 2.3.1.86	0,804	0,005
Ингибитор транскетолазы	EC 2.2.1.1	0,798	0,002
Ингибитор галактозооксидазы	EC 1.1.3.9	0,792	0,003
Ингибитор малатдегидрогеназы	EC 1.1.1.37	0,78	0,002
Ингибитор глициндегидрогеназы	EC 1.4.1.10	0,768	0,003
Ингибитор транс-2-еноил-КоА-редуктазы	EC 1.3.1.38	0,773	0,013
Ингибитор инозитол-трифосфат-3-киназы	EC 2.7.1.127	0,756	0,002
Ингибитор IgA-специфической сериновой эндопептидазы	EC 3.4.21.72	0,754	0,005
Ингибитор орнитинциклодезаминазы	EC 4.3.1.12	0,693	0,004
Ингибитор инсулиназы	EC 3.2.1.7	0,733	0,004
Ингибитор супероксиддисмутазы	EC 1.15.1.1	0,639	0,009
Ингибитор пируваткиназы	EC 2.7.1.40	0,633	0,004
Промотор инсулина		0,616	0,022
Ингибитор триптофантрансаминазы	EC 2.6.1.27	0,551	0,005
Ингибитор фенилаланин-4-гидроксилазы	EC 1.14.16.1	0,544	0,004
Ингибитор цитохром b5 редуктазы	EC 1.6.2.2	0,548	0,019

Приведенные данные свидетельствуют о том, что лактату присущи различные механизмы влияния на активность факторов, регулирующих внутри- и межклеточные взаимодействия. Отмечается участие лактата в белковом, углеводном и липидном обменах.

Широко известно влияние лактата на процессы углеводного обмена, в частности ингибирующее влияние на L-лактатдегидрогеназу (P_a 0,892), пируватдегидрогеназу (P_a 0,892). Однако показано, что кроме этого, молочная кислота оказывает ингибирующее действие и на следующие ферменты: лактат-2-монооксигеназа (P_a 0,935), фосфоенолпируват фосфотрансфераза (P_a 0,922), 1,4-лактоназа (P_a 0,921), глюкозооксидаза (P_a 0,889), транскетолаза (P_a 0,798), галактозооксидаза (P_a 0,792), малатдегидрогеназа (P_a 0,78), инозитол-трифосфат-3-киназы (P_a 0,756), пируваткиназа (P_a 0,633). Интересными стали данные, что лактат является промотором синтеза инсулина (P_a 0,66), ингибирует инсулиназу (P_a 0,77), тем самым, очевидно, поддерживая необходимое количество этого гормона в крови.

Подтверждением участия лактата в регуляции белкового обмена являются факты выявления ингибирующего влияния на ряд ключевых ферментов: нуклеозид-трифосфатазу (P_a 0,922), серин-3-дегидрогеназу (P_a 0,886), аланинтрансаминазу (P_a 0,83), глициндегидрогеназу (P_a 0,768), орнитинциклодезаминазу (P_a 0,693), триптофантрансаминазу (P_a 0,551), фенилаланин-4-гидроксилазу (P_a 0,544). Указывается участие молочной кислоты в процессе ингибирования НАДФН метилентетрагидрофолатредуктазы (P_a 0,88). Таким образом, отмечается влияние лактата не только на процессы катаболизма белка, но и на процессы его синтеза.

Интересным представляется тот факт, что лактат может изменять метаболизм липидов, проявляя ингибирующее влияние на транс-2-еноил-КоА-редуктазу (P_a 0,773), принимающую участие в элонгации жирных кислот в митохондриях и биосинтезе ненасыщенных жирных кислот, на цитохром b5 редуктазу (P_a 0,548), десатуразу, которая участвует в образовании полиненасыщенных жирных кислот, это может служить мощным патогенетическим механизмом нарушений структурных образований в связи с дефицитом полиеновых жирных кислот.

Кроме того, нами было отмечено влияние лактата на состояние антиоксидантных систем организма, в частности на фермент супероксиддисмутазу (P_a 0,639). Являясь ингибитором данного фермента, лактат способен замедлять процесс защиты клеток от реакций свободно-радикального окисления, постоянно протекающих в организме, создавая условия для окислительного стресса, повреждения молекул и структур.

Лактату присуще влияние на процессы тканевого дыхания – ингибирование НАДН цитохром С редуктазы (P_a 0,862), вероятно, тем самым снижая поток электронов по пути окислительного фосфорилирования в митохондриях.

Обращает на себя внимание иммуномодулирующий эффект (Pa 0,811) лактата, реализуемый посредством ингибирования IgA-связанных протеаз: IgA-специфической металлоэндопептидазы (Pa 0,898), IgA-специфической сериновой эндопептидазы.

Изучив *in silico* потенциальные возможности лактата, мы приступили к серии модельных экспериментов. Оценку влияния естественного метаболита лактата на антиген-антительные комплексы ABO системы проводили с учетом изменения степени и скорости наступления агглютинации. Выявлено, что наиболее подвержен воздействию лактата гликопротеин А второй группы крови – время наступления агглютинации увеличилось на 40 %. Гликопротеин В третьей группы крови менее подвержен воздействию внешнего стимула (рис. 2). Антигенные детерминанты А и В четвертой группы крови по разному взаимодействовали с моноклональными антителами: время агглютинации гликопротеина А увеличилось на 51 %, гликопротеина В на 35 %. Степень агглютинации гликопротеинов II–IV групп крови осталась неизменной по сравнению с контрольной и составила 4+. Эритроциты А (II) и АВ (IV) группы, на поверхности которых присутствует гликопротеин А, медленнее вступали во взаимодействие с моноклональными антителами, чем эритроциты В(III) и АВ (IV) групп крови, на мембране которых располагается антигенная детерминанта агглютиногена В.

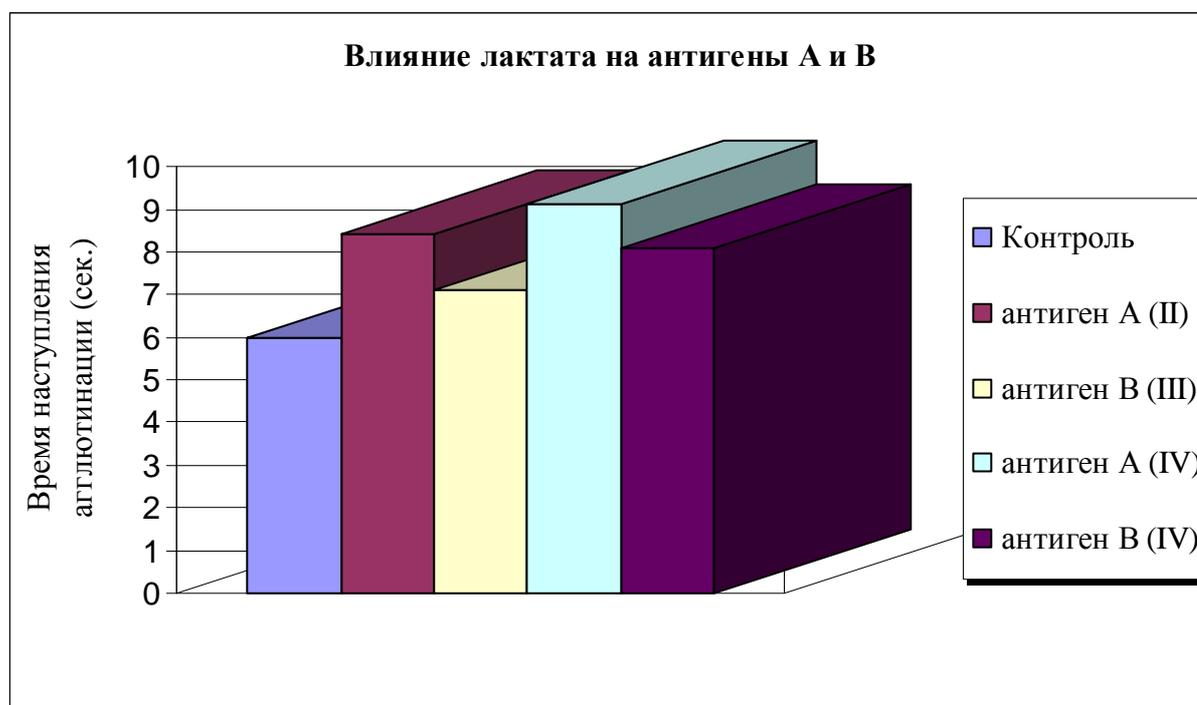


Рис. 2. Влияние лактата на антигены ABO системы

Несколько другой эффект вызывает контакт лактата с естественными антителами (рис. 3). Показано, что действие этого метаболита на систему цельной крови вызывает модификацию иммуноглобулинов плазмы человека Полнота взаимодействия с анти-А

антителами выше, чем с анти-В антителами, при этом происходит уменьшение степени агглютинации на 41 % и 60 % соответственно по сравнению с исходными значениями.

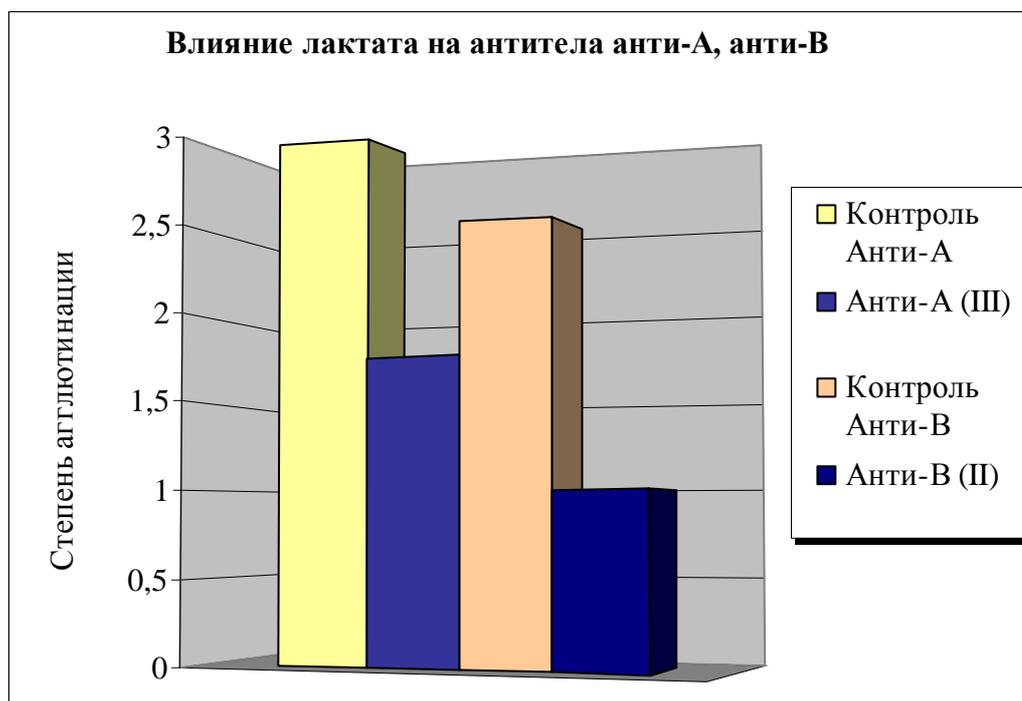


Рис. 3. Влияние лактата на естественные антитела АВ0 системы

Три серии модельных экспериментов по изучению влияния интермедиата на изолированные белки – антигены А и В, моноклональные и естественные антитела показали, что введение лактата в систему антиген-антитело вызывает увеличение времени наступления агглютинации гликопротеина А с соответствующим антителом и снижение ее степени у естественных анти-В антител. По-видимому, выявленные отличия во взаимодействии гликопротеинов с антителами обусловлены особенностями их строения.

Установлено, что преинкубация лактата с моноклональными антителами обуславливает ухудшение узнавания моноклональных антител антигенными детерминантами А и В II–IV групп крови, замедляет время образования антиген-антительных комплексов, а также выраженность степени агглютинации на 75 %. Время взаимодействия эритроцитов А(II) и В(III) группы крови с моноклональными анти-А и анти-В антителами, преинкубированными с лактатом, увеличилось в 20 и 15 раз соответственно. Аналогично влияние лактата на моноклональные антитела с антигенными детерминантами эритроцитов АВ(IV) группы (рис. 4). Исходя из полученных данных, можно предположить, что инкубация с лактатом приводит к структурно-функциональным изменениям благодаря высокой химической активности данной гидроксикислоты, наличию отрицательного заряда. Реально предположить модифицирующее действие на белок за счет неферментативного взаимодействия.

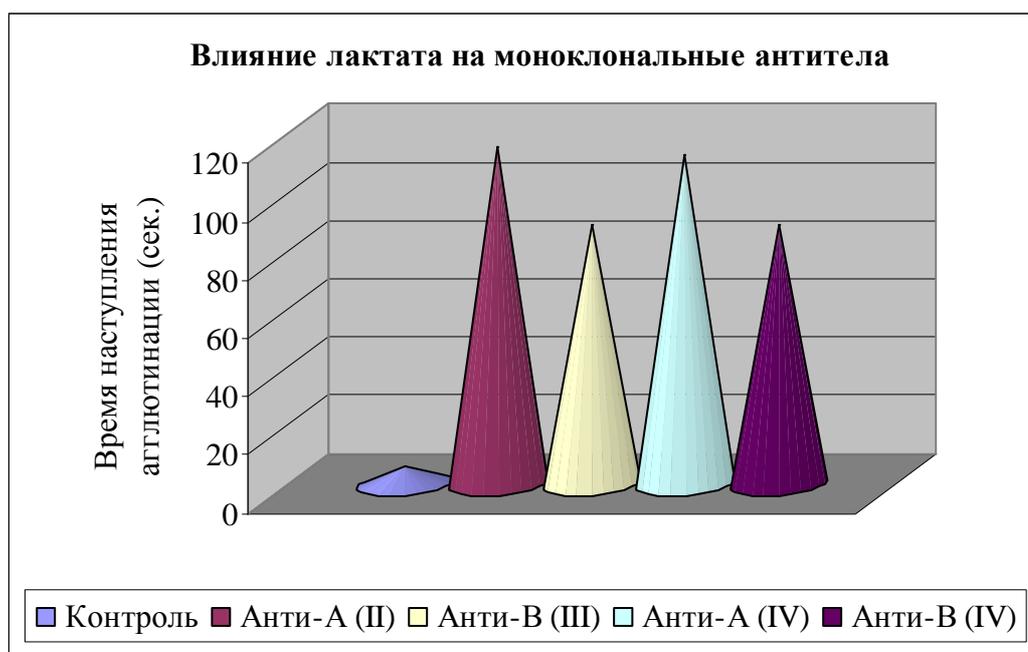


Рис. 4. Влияние лактата на моноклональные антитела

Заключение

Полученные результаты методом компьютерного прогнозирования показывают вероятность влияния лактата на межмолекулярные процессы поддержания метаболического баланса путем регуляции белкового, углеводного, липидного обменов, антиоксидантных процессов, тканевого дыхания. Серия проведенных экспериментов отчетливо показала активное влияние лактата на белок-лигандные взаимодействия антигена с антителом, что является результатом суммарных модификаций, вызванных этим метаболитом и регистрируемых по скорости и полноте процесса агглютинации. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования естественных интермедиатов, в частности лактата, в качестве молекулярных зондов и перспективности использования гликопротеинов А и В, презентированных на мембране эритроцитов, в качестве молекулярной модели для изучения межмолекулярных взаимодействий. В целом, молекулярное моделирование и прогнозирование позволяет углубить фундаментальные знания об известных свойствах малых молекул и предсказать возможные биологические эффекты и молекулярные механизмы их реализации в процессах сложных взаимодействий между лигандами и их мишенями.

Список литературы

1. Гильмиярова Ф. Н. Минорные компоненты метаболизма в изучении белок-белковых взаимодействий // Клиническая лабораторная диагностика. – М., 2013. – № 9. – С. 10.

2. Жирнов О. П. pH-зависимые перестройки в структуре вируса гриппа // Вопросы вирусологии. – 2014. – Т. 59, № 3. – С. 41-46.
3. Филимонов Д. А. Прогноз спектра биологической активности органических соединений // Ж. Рос. Хим. Об-ва им. Д. И. Менделеева. – 2006. – Т. L, № 2. – С. 66-75.
4. Шахнович Е. А., Гильмиярова Ф. Н., Радомская Н. С., Колотьева Н. А., Нефедова Н. С., Рыскина Е. А. Способ оценки действия биологически активных веществ на антиген-антительное взаимодействие // Патент на изобретение № 2484480 от 10.06.2013.
5. Ярцев В. Н. Парадоксальное действие ацидоза на нейрогенный тонус кровеносных сосудов в условиях низкой температуры // Биомед. радиоэлектрон. – 2014. – № 4. – С. 84-85.
6. Gilmiarova F. N. The effect of Pyruvate on Antibody Interaction with Group-Specific Erythrocyte Antigens // Biomedical chemistry. – 2014. – Vol. 8, no. 3. – pp. 260-265.
7. Li X. Systematic investigation of protein-small molecule interactions // IUBMB Life. – 2013. – Vol. 65(1). – pp. 2-8.
8. Marsh W. L. Scoring of hemoagglutination reaction. Transfusion, 1972. – pp. 352-353
9. Poroikov V. Computer-aided prediction of biological activity spectra. Application for finding and optimization of new leads // Rational Approaches to Drug Design, Eds. H.-D. Holtje, W. Sippl, Prous Science, Barcelona. – 2001. – pp. 403-407.
10. Rogatzki M. J. Lactate is always the end product of glycolysis // Frontiers in neuroscience. – 2015. – Vol. 9, no. 22. – pp. 1-7.