

## РОЛЬ ЛАКТАТА В МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВЫХ СТРУКТУР

Ф.Н. Гильмиярова<sup>1</sup>, Н.А. Колотьева<sup>1</sup>, В.И. Потехина<sup>1</sup>, Г.М. Баишева<sup>1</sup>, Е.А. Рыскина<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет»,

<sup>2</sup>ФГАОВ ВО «Российский университет дружбы народов», г. Москва,

*Гильмиярова Фрида Насыровна – e-mail: bio-sam@yandex.ru*

Цель исследования: определение влияния минорного компонента метаболизма лактата на белок-белковое взаимодействие. Объектом исследования являлась молекулярная модель АВО системы крови. Действие лактата изучалось в опытах *in vitro*: на гликопротеины А и В, естественные и моноклональные анти-А и анти-В антитела путем предварительной преинкубации системы с раствором препарата в конечной концентрации 2 мМ. Лактат специфично изменяет узнавание и полноту взаимодействия антигенов А и В эритроцитов А (II), В (III) групп крови с антителами. Произведена количественная оценка вызванных изменений.

**Ключевые слова:** лактат, белок-белковое взаимодействие, гликопротеины А и В.

The aim of the study was to determine the influence of the minor component of the metabolism lactate on protein-protein interaction. The object of the study was the molecular ABO blood system model. The effects of lactate were studied *in vitro*: A and B glycoproteins, natural and monoclonal anti-A and anti-B antibodies by preincubation with a solution of lactate in a final concentration of 2 mM. Lactate changes specifically the recognition and completeness of A and B antigens with A (II), B (III) red blood cells and antibodies. Quantitative assessment of induced modifications were counted.

**Key words:** lactate, protein-protein interaction, glycoproteins A and B.

### Введение

Долгое время в научной литературе лактат расценивался как тупиковый метаболит, а понимание его биохимической функции исчерпывалось участием в анаэробном превращении глюкозы [1–4]. Последнее десятилетие ознаменовалось сдвигом в изучении роли малых метаболитов в регуляции основных метаболических путей, а также их влияния на белок-РНК, белок-ДНК взаимодействия [5]. Стало известно, что содержание лактата в крови и других биологических жидкостях не является константным, а тонко реагирует на патологические изменения в организме и является сигнальным маркером для некоторых синдромов [6, 7]. Накопленные данные о влиянии низкомолекулярных метаболитов пирувата и этанола на антиген-антительные процессы подтверждают актуальность исследования влияния малых анализитов на взаимодействие белок-лиганд [8, 9].

**Целью данного исследования** является определение влияния минорного компонента метаболизма лактата на белок-белковое взаимодействие.

### Материал и методы

Объектом исследования является молекулярная модель АВО системы с последующим изучением влияния естественных метаболитов лактата на антиген-антительное взаимодействие (патент на изобретение № 2484480 от 10.06.2013). Нами изучено пространственное строение антигенов АВО системы: на мембране эритроцита А(II) группы крови находится А-антиген – гликопротеин с терминальным N-ацетилгалактозамином, на мембране эритроцита В(III) группы крови гликопротеин с терминальной галактозой (В-антиген) [10–12].

Действие лактата изучалось в опытах *in vitro*: на гликопротеины А и В, естественные и моноклональные анти-А и анти-В антитела путем предварительной преинкубации системы с раствором препарата в конечной концентрации 2 мМ. Осуществлялась реакция геагглютинации с индикацией степени по W. Marsh (балльная оценка интенсивности агглютинации – pt).

Статистический анализ данных проводили в среде статистического пакета прикладных программ SPSS 12.0 и в программе MS EXCEL 2010.

### Результаты и их обсуждение

При анализе времени начала агглютинации эритроцитов А(II) и В(III) групп крови обращает внимание способность лактата замедлять процесс вступления антигенов А и В в реакцию агглютинации (таблица 1). Антигенная детерминанта А показывает меньшую устойчивость к введению лактата в экспериментальную систему – время начала агглютинации по сравнению с контролем увеличилось на 41,6%, в то время как для антигенной детерминанты В разница во времени начала агглютинации составила 16,6%.

Следующую серию экспериментов мы проводили при инкубации естественных антител и измеряли степень агглютинации (таблица 2). Выявлено, что лактат оказывает тормозное воздействие на степень агглютинации как анти-А, так и анти-В антител по сравнению с контролем. Однако, можно заметить, что анти-В антитела подвержены более выраженному воздействию со стороны лактата, отмечается замедление реакции агглютинации на 62,5% по сравнению с контролем.

В таблице 3 приводятся результаты оценки степени агглютинации после воздействия лактата на моноклональные

антитела. Лактат вызывает снижение степени агглютинации как анти-А, так и анти-В моноклональных антител с эритроцитами. При этом важно отметить, что в данном эксперименте результаты не отличаются по воздействию на анти-А и анти-В моноклональные антитела: в обоих опытных образцах отмечается снижение степени агглютинации на 75% в сравнении с контролем.

Исследуя влияния лактата на время начала агглютинации моноклональных антител с эритроцитами, выяснили, что введение лактата приводит к задержке начала агглютинации как для анти-А, так и для анти-В антител (таблица 4).

**ТАБЛИЦА 1.**

*Влияние лактата на время начала агглютинации эритроцитов А(II), В(III) групп крови (с)*

Статистич. показатель (n=30)	Контроль антиген А (II)	Антиген А А(II)	Контроль антиген В В(III)	Антиген В В(III)
M±m	6,0±0,1	8,5±0,16	6±0,1	7,0±0,22
Me	5,9	8,0	6,0	7,0
Δ%	-	+41,6	-	+16,6
p		p<0,001		p<0,01

**ТАБЛИЦА 2.**

*Оценка степени агглютинации после предварительной инкубации естественных антител плазмы крови с лактатом (pt)*

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

**ТАБЛИЦА 3.**

*Оценка степени агглютинации после предварительной инкубации моноклональных антител плазмы крови с лактатом (pt)*

Статист-ий показатель (n=30)	Контроль анти-А антитела	Анти-А антитела	Контроль анти-В антитела	Анти-В антитела
M±m	12	3,0 ±0,38	12	3,0±0,41
Me	12	3	12	3
Δ%	-	-75	-	-75
P		p<0,001		p<0,001

**ТАБЛИЦА 4.**

*Влияние лактата на время начала агглютинации моноклональных антител с эритроцитами А(II), В(III) групп крови (с)*

Статист-ий показатель (n=30)	Контроль анти-А антитела	Анти-А антитела	Контроль анти-В антитела	Анти-В антитела
M±SD	6,0±0,03	115,5 ±1,38	6,0±0,04	88,5±1,97
Me	6	109,3	6	90,7
Δ%	-	+1825	-	+1375
P		p<0,001		p<0,001

Примечательно, что в данном эксперименте анти-А антитела демонстрируют большую чувствительность к воздействию лактата – время начала агглютинации составило 115,5 секунд (6 секунд – для контрольного образца).

**Выводы**

Серия проведенных экспериментов *in vitro*: изучение воздействия лактата на антигены А и В, естественные и моноклональные антитела, позволила прийти к заключению о влиянии лактата на белок-лигандные взаимодействия антигена с антителом.

Введение лактата в систему антиген-антитело вызывает ряд модификационных перестроек в антигенных детерминантах, которые проявляются изменениями в степени и времени начала агглютинации. Установлено, что антиген А проявляет большую чувствительность, чем антиген В, к присутствию лактата.

Мы склонны считать, что регистрируемые изменения связаны с химическим строением молекулы лактата, которая является гидроксикислотой и несет на себе отрицательный заряд.

Вышеизложенное позволяет предположить возможность лактатацидемии оказывать модифицирующее влияние на белок-белковое, белок-рецепторное, фермент-субстратные и др. взаимодействия, широко представленные в организме человека.

**Заключение**

Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования естественных интермедиатов, в частности лактата, в качестве молекулярных зондов и перспективности использования гликопротеинов А и В, презентируемых на мембране эритроцитов, в качестве молекулярной модели для изучения межмолекулярных взаимодействий.

Проведенные эксперименты помогают приблизиться к пониманию сути межмолекулярного взаимодействия тонких структур и углубить знание биохимических основ фундаментальных процессов жизнеобеспечения организма.

**ЛИТЕРАТУРА**

- Rogatzki M.J. Lactate is always the end product of glycolysis. *Frontiers in neuroscience*. 2015. Vol. 9. № 22. P. 1-7.
- Gladden L.B. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *J Physiol*. 2004. Jul 1. № 558. P. 5-30.
- Philp A., Adam L. Macdonald, Peter W. Watt Lactate – a signal coordinating cell and systemic function. *Journal of Experimental Biology*. 2005. Vol. 208. P. 4561-4575.
- Gladden L.B. A lactatic perspective on metabolism. *Med Sci Sports Exerc*. 2008. Mar. № 40 (3). P. 477-485.
- Xiyun Li Systematic investigation on protein small molecule interaction. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*. 2013. Vol. 65. P. 2-8.
- Selezneva I.A. AB0-blood group system and morbidity. *European journal of natural history*. 2017. Vol. 1. P. 14-21.
- Гильмиярова Ф.Н. Ключевые показатели углеводного обмена у клинически здоровых людей с различной групповой принадлежностью крови по системе АВ0. *Казанский медицинский журнал*. 2013. № 5. С. 672-674.
- Gil'miarova F.N. *Ключевые показатели углеводного обмена у клинически здоровых людей с различной групповой принадлежностью крови по системе АВ0. Казанский медицинский журнал*. 2013. № 5. P. 672-674.

8. Gilmiyarova F., Kolotyeva N., Radomskaya V., Gusyakova O., Gorbacheva I., Potekhina V. Role of the Metabolic Minor Components in the Regulation of Intermolecular Interaction. *Journal of Biosciences and Medicines*. 2016. № 4. P. 28-35. doi: 10.4236/jbm.2016.47004.

9. Gylmiyarova F.N., Radomskaya V.M., Gusyakova O.A. et al. The effect of Pyruvate on Antibody Interaction with Group-Specific Erythrocyte Antigens. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B*. 2014. Vol. 8. P. 260-265. doi:10.1134/S1990750814030056.

10. Гильмиярова Ф.Н. Антигены АВ0 системы. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2013. № 8. С. 21-27.

*Gil'miiaarova F.N. Antigeny` AV0 sistemy`. Voprosy` biologicheskoi`, medicinskoj` i farmatsevticheskoi` himii. 2013. № 8. P. 21-27.*

11. Гильмиярова Ф.Н., Гергель Н.И., Давыдкин И.Л., Косякова Ю.А., Епифанова А.А. АВ0-группспецифические особенности эритроцитов в норме и при гемофилии. *Гематология и трансфузиология*. 2012.

*Gil'miiaarova F.N., Gergel` N.I., Davy`dkin I.L., Kosiakova Iu.A., Epifanova A.A. AV0-gruppospetsificheskie osobennosti e`ritrotcitov v norme i pri gemofilii. Gematologiya i transfuziologiya. 2012.*

12. Yamamoto F. Molecular genetics of ABO. *Vox Sang*. 2000. Vol. 78. Suppl. 2. P. 91-103.



УДК: 577.175.524:616.61+616.379-008.64

Код специальности ВАК: 14.01.02, 14.01.04

## НЕФРИН – РАННИЙ МАРКЕР ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2-ГО ТИПА

Н.А. Яркова,

ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная медицинская академия»

*Яркова Наталья Александровна – e-mail: n.yarkova@mail.ru*

Цель: определить величину экскреции с мочой нефрина и уточнить его значение как раннего маркера повреждения почек при сахарном диабете (СД) 2-го типа. Материалы и методы. Были обследованы 97 пациентов с СД 2-го типа. Средний возраст больных составил 56 [51,7; 64] лет, по данным анамнеза средняя длительность СД 2-го типа 7,6 [1,5; 8,9] года. Всем пациентам определяли нефрин, микроальбумин, креатинин, рассчитывали скорость клубочковой фильтрации (СКФ) по формулам. Результаты. По данным исследования повышение уровня нефрина в моче наблюдалось у всех обследованных пациентов СД 2-го типа. Нефринурия при диабетической нефропатии коррелирует с альбуминурией, уровнем креатинина, гликозилированным гемоглобином, артериальным давлением и СКФ. Заключение. Структурные и функциональные нарушения подоцитов, ассоциированные с метаболическими, эндокринными и гемодинамическими расстройствами при СД 2-го типа, наблюдаются уже на ранних этапах формирования диабетической нефропатии (ДН), предшествуя развитию клинически значимой альбуминурии.

**Ключевые слова:** нефрин, биомаркеры, хроническая болезнь почек, сахарный диабет 2-го типа.

Objective: determine nephrin in urine and clarify its significance as an early marker of kidney damage in type 2 diabetes mellitus. Materials and methods. 97 patients with type 2 diabetes were examined. Mean age of patients was 56 [51,7; 64] years, according to the history of the average duration of type 2 diabetes 7,6 [1,5; 8,9] years. All patients were assigned nephrin, microalbumin, creatinine, calculated the glomerular filtration rate (GFR) by formulas. Results. According to the study, an increase in the level of nephrin in the urine was observed in all examined patients with type 2 diabetes. Nephrinuria in diabetic nephropathy correlates with albuminuria, creatinine, glycosylated hemoglobin, arterial pressure, and GFR. Conclusion. Structural and functional disorders of podocytes, associated with metabolic, endocrine and hemodynamic disorders in type 2 diabetes, are already observed at the early stages of the formation of diabetic nephropathy, preceding the development of clinically significant albuminuria.

**Key words:** nephrin, biomarkers, chronic kidney disease, diabetes mellitus.

### Введение

Традиционно основной патологический процесс в почках определяют по концентрации креатинина в сыворотке крови, скорости клубочковой фильтрации и микро/макроальбуминурии [1]. Однако, как показали морфологические исследования, характерные для сахарного диабета (СД) изменения в ткани почек уже выявляются у пациентов с нормальной экскрецией альбумина с мочой, появление микроальбуминурии (МАУ) свидетельствует о наличии склероза не менее чем в 20–25% нефронов, а прогрессирование до стадии протеинурии (ПУ) – о поте-

ре 50–70% клубочков [2; 3]. В результате активного поиска методов ранней диагностики появился маркер, способный выявлять повреждение почек раньше, чем традиционные показатели.

Нефрин, трансмембранный белок подоцитов с м.м. 160 кДа, продукт гена NPHS1, является основным структурным белком щелевой фильтрационной диафрагмы и относится к адгезивным белкам суперсемейства иммуноглобулинов [4; 5]. Участвует в формировании почечного фильтра, при повреждении почек наблюдается усиленная экскреция с мочой. Уточнение механизмов