

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.11: 616.155.1-097

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ПИРУВАТА НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНТИТЕЛ С ГРУППО-СПЕЦИФИЧНЫМИ АНТИГЕНАМИ ЭРИТРОЦИТОВ

Ф.Н. Гильмиярова^{1}, В.М. Радомская¹, О.А. Гусякова¹, Е.А. Рыскина²,
Н.А. Колотьева¹, Е.А. Шахнович¹, Н.С. Нефедова¹, И.Ф. Сидорова¹,
Г.М. Баишева¹, Ю.В. Перова¹, А.П. Плеть³*

¹Самарский государственный медицинский университет,
443099, Самара, ул. Чапаевская, 89; тел.: (846)3370463, эл. почта: bio-sam@yandex.ru

²Российский университет дружбы народов, Москва

³Московский государственный медико-стоматологический университет
имени А.И. Евдокимова, Москва

На модели антиген-антителой системы АВО исследовали влияние естественного метаболита пирувата на взаимодействие антител с антигенами эритроцитов, определяющих их групповую специфичность. Эритроциты А(II)-AB(IV) групп крови, моноклональные анти-А и анти-В антитела до постановки реакции агглютинации инкубировали с раствором пирувата. Визуализацию агглютинатов проводили цитофлуориметрически и с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. При прогнозировании спектра биологической активности пирувата с помощью компьютерной программой "PASS" предсказаны основные пути регуляции, в которые может быть вовлечено это соединение. Доказано, что пируват может регулировать интенсивность взаимодействия антиген-антитела. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования малых молекул, в частности пирувата, в качестве молекулярных зондов и перспективности применения эритроцитов с экспрессированными на их мембранах антигенными детерминантами системы АВО для изучения белок-белковых взаимодействий в силу наглядности визуализации, возможности количественной оценки этого процесса.

Ключевые слова: белок-белковое взаимодействие, антигены АВО, моноклональные антитела, пируват, конфокальная микроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

Ферментативные и неферментативные процессы, протекающие в организме, сопровождаются изменением химического состава внутри- и внеклеточной среды, что отражается на протеомном балансе, количестве других высоко- и низкомолекулярных соединений в биологических жидкостях. Изучение этих изменений представляет особый интерес, так как позволяет получить информацию о биологических процессах, механизмах их регуляции. В настоящее время изучается генетическая составляющая постоянства

и изменчивости метаболизма [1, 2]. Актуальным является выяснение молекулярной специфики обменных процессов, факторов эндогенной природы, определяющих физиологический, адекватный запросам организма уровень обмена и характер индивидуальной реакции. Одним из таких параметров, на наш взгляд, является генетически детерминированный признак – групповая принадлежность крови, с которым ассоциированы особенности клеточного состава крови, показатели углеводного, липидного, белкового и минерального обменов, создаются предпосылки для развития различной патологии [3-6].

* - адресат для переписки

Как известно, огромное антигенное разнообразие, которое окружает человека, привело в процессе естественного отбора к дифференцировке вида *Homo hominis* на 4 типа. Те, у кого нет антигенов А и В, имеют альфа и бета антитела [7]. Установлено, что антигены АВО обнаруживаются не только на мембранах эритроцитов, но и на эндотелиальных и эпителиальных клетках, а также экспрессируются на клетках различных органов и тканей – в почках, сердце, коже, в костном мозге, в печени и в других, имея общебиологическое значение [8, 9]. Современные представления о структуре и топографии антигенов А,В,Н позволяют объяснить их высокую иммуногенность, роль в формировании иммунного ответа, защите клеток от чужеродного материала [10-12]. В этом плане перспективным является исследование антигенов и антител АВО системы в качестве объектов межмолекулярных, в том числе белок-белковых взаимодействий.

Целью настоящего исследования было выяснение влияния естественного метаболита пирувата на белок-белковое взаимодействие на модели антигенов и антител системы АВО.

МЕТОДИКА

Под наблюдением находилось 446 лиц, которые в соответствии с информированным соглашением участвовали в исследованиях. Их клиническое состояние подтверждалось отсутствием обострения хронических соматических и стоматологических заболеваний, а также латентных социально значимых вирусных инфекций, из них мужчин – 142 человек, а женщин – 304 человека, средний возраст составил $26,8 \pm 1,4$ лет. Распределение по групповой принадлежности крови оказалось следующим: лиц с 0(I) группой крови – 29,6%, с А(II) группой крови – 31,8%, с В(III) группой крови – 24,3%, с АВ(IV) группой крови – 14,3%. Материалом для исследования служила цельная кровь, которую получали из локтевой вены в объёме 5 мл путём венопункции в пробирки для взятия крови фирмы “VACUTAINER” (США), где в качестве консерванта используется раствор ЭДТА в концентрации 1 мг/мл. Кровь центрифугировали 15 минут при 1700 g.

Определение группы крови проводили с использованием ЭРИТРОТЕСТ Анти-А, Анти-В моноклональных антител методом прямой агглютинации на плоскости. Агглютинацию подсчитывали по W. Marsh [13] с индикацией степени агглютинации (бальная оценка интенсивности агглютинации – pt).

Определение группы крови также проводили на автоматическом анализаторе для иммуногематологических исследований Хемос СП II фирмы “BIO-Rad” (США) с использованием реактивов TransClone Anti-AB01 (А), TransClone Anti-AB02 (В), TransClone Anti-AB03 (AB) (“BIO-Rad”). Анализатор производит автоматизированно внесение и разведение реагентов и образцов в 96-луночные микропланшеты при помощи координированного робота-манипулятора с 4-х канальным дозатором для внесения образцов, контролей и реагентов. Микропланшеты с внесенными образцами, реагентами и стандартными эритроцитами инкубировали на перемешивающем устройстве PSU-2Т. Полученные результаты реакции гемагглютинации в лунках регистрировали с помощью фотометра для микропланшет PR 3100, который управлялся компьютером с программным обеспечением HEMOSMR.

Для изучения действия пирувата на антигены А, В и моноклональные анти-А и анти-В антитела в работе использовали следующий дизайн исследования. Первый вариант – преинкубация эритроцитов А(II), В(III) и АВ(IV) групп крови в количестве 100 мкл с раствором пирувата в конечной концентрации 2 мМ в течение 5 мин, далее постановка реакции гемагглютинации с анти-А и анти-В моноклональными антителами. Второй вариант – инкубация моноклональных анти-А и анти-В антител с раствором пирувата в конечной концентрации 2 мМ в течение 5 мин, затем постановка реакции агглютинации на плоскости. В качестве контроля использовали образцы без добавления пирувата. Концентрация пирувата превышала его физиологическое содержание в крови с целью моделирования состояния гиперпируватемии. Каждый эксперимент выполняли в трёх повторях, расхождение данных составляло не более 5%.

У всех обследованных лиц определяли содержание пировиноградной кислоты в крови на автоматическом биохимическом анализаторе “Hitachi-902” фирмы “Roche Diagnostics” (Япония) с помощью набора реактивов фирмы “Абрис” (Россия) ферментативным кинетическим методом, основанном на катализируемом лактатдегидрогеназой превращении пирувата в L-лактат с одновременным эквивалентным окислением NADH в NAD⁺.

Подсчёт эритроцитов производили на автоматическом гематологическом анализаторе “Sysmex KX-21” (Япония) с помощью набора реактивов фирмы “Roche Diagnostics”. Цельную кровь, взятую при помощи вакуумной системы

с антикоагулянтом ЭДТА, разводили раствором FAXflow до концентрации 1×10^6 эритроцитов. Перед началом опыта 100 мкл разведённых эритроцитов инкубировали с раствором пирувата в конечной концентрации 2 мМ в течение 5 мин. Затем проводили реакцию эритроцитов со специфичными моноклональными антителами Blood group A antigen (Z2A), Blood group B antigen (89-F), меченными флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) фирмы "Santa Cruz biotechnology, Inc." (США) в полистироловых пробирках в течение 20 мин в темноте. Таким образом, для анализа с помощью конфокальной микроскопии использовали разведённые эритроциты, преинкубированные с раствором пирувата, а после взаимодействия с антителами, конъюгированными с флуорохромным красителем; в качестве контроля использовали эритроциты без добавления пирувата. После инкубации полученный комплекс эритроцитов с антителами тщательно перемешивали на вортексе и добавляли 2 мл раствора FAX flow. Регистрацию изображений проводили в чашке Петри. Состав солевого раствора FAX flow: KH_2PO_4 – 0,02%, Na_2HPO_4 – 0,2%, NaCl – 0,8%, KCl – 0,01%, ЭДТА – 0,03%, вода – 98,9%.

Исследования проводили при помощи экспериментального стенда, который реализован на базе конфокального оптического микроскопа Olympus IX 71 ("Olympus", Япония), конфокального сканирующего блока и лазерного комбайна (фирма "Andor"). Для возбуждения флуоресценции FITC применяли лазер с длиной волны 488 нм. Размер микроснимков составлял 400×400 мкм, достигнутое разрешение – 400 нм на пиксель. В нашем исследовании мы исключили неспецифическую аутофлуоресценцию эритроцитов и их комплексов с моноклональными антителами немечеными флуоресцентным красителем.

Исследование проведено на проточном цитофлуориметре FACS Calibur компании "Beckton Dickinson" (США). Для исследования использовали цельную кровь, предварительно разведённую раствором FAX flow и преинкубированную с пируватом, а затем с мечеными моноклональными антителами (как описано выше). В качестве контроля использовали разведённые эритроциты без добавления пирувата. Для дополнительного контроля специфичности взаимодействия эритроцитов с мечеными антителами проводили реакцию эритроцитов 0(I) группы крови с анти-А и анти-В антителами. После инкубации полученный комплекс антиген-антитело

тщательно перемешивали на вортексе, к смеси добавляли 2 мл раствора FAX flow, затем пробирку помещали в пробозаборник проточного цитометра. Анализ антигенной экспрессии осуществляли на проточном цитометре. Возбуждение флуоресценции происходило при прохождении клеткой фокального пятна аргонового лазера, охлаждаемого воздухом (мощность 15 мВт, испускаемая длина волны 488 нм). Учёт флуоресценции осуществляли при 561 нм для FITC. Таким образом получали данные по прямому (FSC – ForwardScatter) и боковому (SSC – SideScatter) светорассеянию, а также по флуоресценции клеток, связавших конъюгированные с флуорохромом антитела. Компенсацию наложения флуоресценции осуществляли средствами программного обеспечения.

Компьютерное прогнозирование спектра биологической активности пирувата проводили с помощью компьютерной системы Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS) на основе структурной формулы соединения [14]. В PASS результат прогноза спектра биологической активности представляется в виде упорядоченного списка названий соответствующих активностей и вероятностей P_a "быть активным" ("to be active") и P_i "быть неактивным" ("to be inactive"), которые являются функциями значений В-статистики для прогнозируемого соединения. Поскольку в нашем случае исследовалась молекула с известной структурой, оптимальным значением вероятности наличия активностей мы считали P_a более 0,5.

Статистический анализ данных проводили в среде статистического пакета прикладных программ SPSS 12.0 и в программе MS EXCEL 2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы нами был охарактеризован спектр прогнозируемой биологической активности пирувата, основанный на структурной формуле соединения и использовании универсального математического алгоритма установления зависимости "структура – активность" с помощью компьютерной программы Prediction of Activity Spectra for substances. У пирувата выявлена вероятность наличия 257 фармакологических эффектов и 1578 механизмов их реализации. Определено 35 возможных побочных и токсических эффектов и 56 метаболических опосредованных действий. Прогнозируемые эффекты пирувата суммированы на рисунке 1.



Рисунок 1. Прогнозируемый компьютерной программой PASSC&T спектр биологической активности пирувата. Кривая обозначает вероятность наличия биологического эффекта.

Обращает внимание наличие способности у пирувата выступать регулятором метаболизма липидов (Ра 0,812), цитопротектором (Ра 0,724), стимулировать лейкопоз (Ра 0,724), ингибировать тромбоцитопоз (Ра 0,519), вызывать гемопротекторный эффект (Ра 0,524), оказывать антигипоксическое (Ра 0,650), антитоксическое (Ра 0,742), действие и другие. В нашей работе мы, прежде всего, решили исследовать влияние пирувата на прочность белок-белковых взаимодействий, лежащих в основе большинства физиологических эффектов пирувата, используя в качестве тест-системы связывание антител с антигенами.

Нами было показано, что у клинически здоровых лиц концентрация пирувата в крови является практически неизменной величиной, причем группа крови не влияет на его концентрацию (табл. 1).

Однако известно, что существенные колебания концентрации пирувата в биологических жидкостях и тканях человека происходят при различных патологиях, а также изменении функционального состояния организма [15, 16].

Для изучения влияния пирувата на взаимодействие антител с антигенами эритроцитов нами была проведена преинкубация эритроцитов А(II), В(III) и АВ(IV) групп крови в присутствии 2 мМ пирувата в течение 5 мин, а затем поставлена реакции гемагглютинации с соответствующими антисыворотками. В условиях *in vitro* после преинкубации с пируватом эритроцитов А(II) группы крови время начала агглютинации увеличилось по сравнению с контролем и с эритроцитами В(III) группы крови (табл. 2).

Таблица 1. Содержание пирувата (мМ) в сыворотке крови клинически здоровых лиц 0(I) - АВ(IV) групп крови.

Группа крови	M±m	min	max	Me	Std. deviation	95%	Q ₁ – Q ₃
0(I)	0,053±0,002	0,026	0,091	0,052	0,012	0,047-0,057	0,045–0,057
А(II)	0,050±0,0017	0,029	0,068	0,048	0,009	0,046-0,053	0,043–0,056
В(III)	0,053±0,0019	0,034	0,062	0,052	0,007	0,048-0,054	0,046–0,057
АВ(IV)	0,047±0,0022	0,038	0,067	0,046	0,008	0,046-0,059	0,040–0,053
Генеральная совокупность	0,051±0,001	0,026	0,091	0,05	0,01	0,049-0,053	0,044–0,056

Таблица 2. Влияние пирувата (2 мМ) на скорость гемагглютинации эритроцитов А (II) и В(III) группы крови.

	Контроль А (II)	Антиген АА (II)	Контроль В(III)	Антиген ВВ(III)
	Время (с)	Время (с)	Время (с)	Время (с)
M±m	6,0±0,00	7,0±0,26*	6,0±0,00	6,4±0,16*
Me	6	7	6	6
95%	6,0–6,0	6,4–7,6	6,0–6,0	6,0–6,8
min	6	6	6	6
max	6	8	6	7
Δ%		+16		+6

Примечание: * - p<0,05.

В аналогичных условиях время наступления агглютинации антигенов А и В эритроцитов АВ(IV) группы крови также возросло, а степень агглютинации выражена слабее, чем в контрольных образцах. Существенно снижается полнота взаимодействия, процесс преципитации белковых комплексов. Можно предположить, что пировиноградная кислота взаимодействует с ионогенными группами антигенных детерминант, что ведёт к замедлению узнавания и к неполноте взаимодействия (табл. 3). Следующим объектом нашего изучения были моноклональные анти-А и анти-В антитела. Установлено, что время взаимодействия эритроцитов А(II) группы крови

с моноклональными антителами в присутствии пирувата уменьшилось по сравнению с данными в контроле, менее значительно – с эритроцитами В(III) группы крови (табл. 4). Характерно, что моноклональные анти-А и анти-В-антитела в присутствии пирувата медленнее взаимодействуют с эритроцитами АВ(IV) группы крови. На наш взгляд, разница в характере узнавания и взаимодействия антител с антигенами АВ(IV) группы крови может быть обусловлена межмолекулярным взаимодействием двух типов антигенов, экспрессированных на мембранах эритроцитов этой группы крови (табл. 5).

Таблица 3. Влияние пирувата (2 мМ) на скорость гемагглютинации эритроцитов АВ(IV) группы крови при добавлении антисывороток к А и В антигенам.

	Контроль АВ (IV)	Антиген А АВ(IV)	Контроль АВ(IV)	Антиген В АВ(IV)
	Время (с)	Время (с)	Время (с)	Время (с)
M±m	6,0±0,00	7,4±0,16*	6,0±0,00	7,4±0,16*
Me	6	7	6	7
95%	6,0–6,0	7,0–7,7	6,0–6,0	7,0–7,7
min	6	7	6	7
max	6	8	6	8
Δ%		+23		+23

Примечание: * - p<0,05.

Таблица 4. Влияние пирувата (2 мМ) на эффективность взаимодействия моноклональных антител с антигенами эритроцитов А (II) и В(III) группы крови.

	Контроль Анти-А	Анти-А	Контроль Анти-В	Анти-В
	Время (с)	Время (с)	Время (с)	Время (с)
M±m	6,0±0,00	4,7±0,15*	6,0±0,00	5,3±0,15*
Me	6	5	6	5
95%	6,0–6,0	4,3–5,0	6,0–6,0	4,9–5,6
min	6	4	6	5
max	6	5	6	6
Δ%		-22		-12

Примечание: * - p<0,001.

ВЛИЯНИЕ ПИРУВАТА НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНТИТЕЛ

Таблица 5. Влияние пирувата (2 мМ) на эффективность взаимодействия моноклональных антител с антигенами эритроцитов АВ(IV) группы крови.

	Контроль Анти-А	Анти-А	Контроль Анти-В	Анти-В
	Время (с)	Время (с)	Время (с)	Время (с)
M±m	6,0±0,00	7,0±0,26*	6,0±0,00	6,7±0,15*
Me	6	7	6	7
95%	6,0–6,0	6,4–7,6	6,0–6,0	6,3–7,0
min	6	6	6	6
max	6	8	6	7
Δ%		+16		+11

Примечание: * - $p < 0,001$.

Таким образом, на основании приведенных выше данных можно предположить, что антигены эритроцитов А(II) и В(III) группы в присутствии пирувата быстрее взаимодействуют с соответствующими моноклональными антителами. При этом преинкубация эритроцитов всех групп крови с пируватом приводит к заметному замедлению реакции гемагглютинации. Возможно, преинкубация с пируватом, влияющим на функциональное состояние эритроцитов, изменяет экспонирование антигенов групп А и В на поверхности эритроцитов или конформационное состояние этих антигенов, что и приводит к обнаруженному эффекту.

Весьма вероятно также, что в основе неоднотипной тенденции выявленных сдвигов могут быть различия в строении А и В антигенов. Оба они содержат общий структурный компонент вещество Н, а групповую антигенную специфичность, как известно, определяют терминальные сахара. У N-ацетилгалактозамина

(А-антигена) в позиции С располагается наиболее реакционноспособный NHCOCH_3 , а у D-галактозы (В-антиген) в этой позиции находится ОН-группа. Специфичность взаимодействия антигенов с антителами определяется особенностями строения поверхностной структуры антигенов – наличием различных химических групп, их пространственным расположением [17, 18].

Для количественной оценки влияния преинкубации эритроцитов с пируватом на взаимодействие моноклональных антител с антигенами был также использован метод проточной цитофлуориметрии. В случае групп крови В(III) и АВ(IV) (при использовании антител против антигена А) количество иммунных комплексов уменьшилось, что совпадает с результатами, приведенными в таблицах 2 и 3. Однако, было установлено, что количество образующихся иммунных комплексов увеличивалось в образцах А(II) группы (рис. 2). Неоднозначность этих результатов

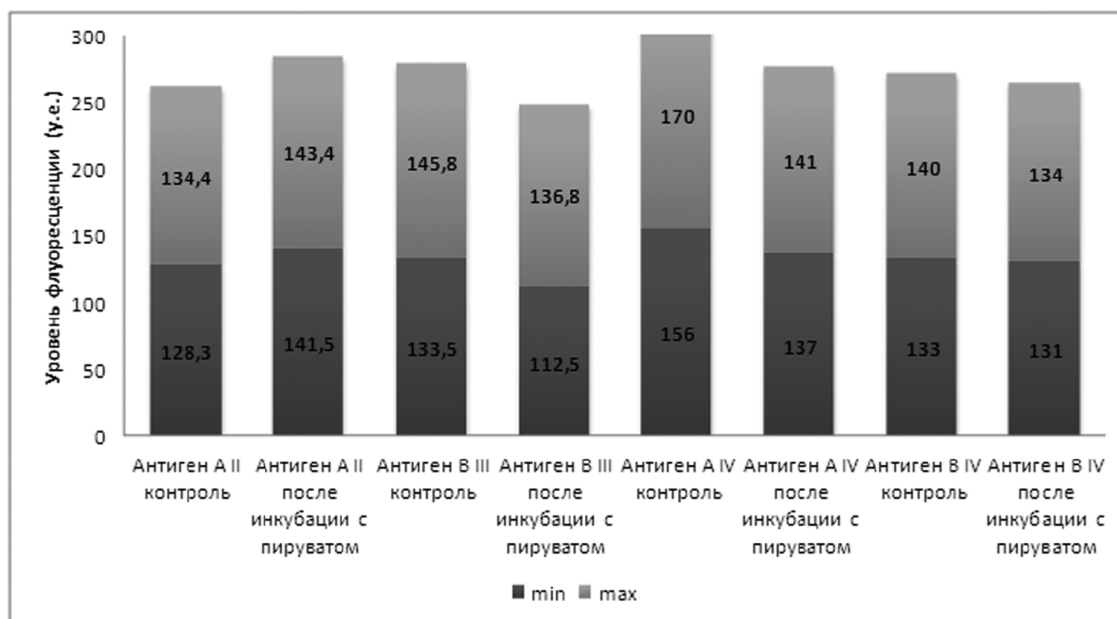


Рисунок 2. Оценка влияния пирувата на антиген-антительное взаимодействие методом проточной цитофлуориметрии.

может быть связана с преобладанием эффекта увеличения эффективности взаимодействия моноклональных антител в присутствии пирувата по сравнению со снижением экспонирования антигенов.

Для получения результатов, подтверждающих данные визуальной оценки влияния пирувата на взаимодействие антиген-антитело, были проведены эксперименты с использованием анти-А и анти-В антител, конъюгированных флуоресцеинсодержащим красителем FITC. Регистрация флуоресценции в фокусе лазерного луча по объёму изображения позволила количественно оценить характер влияния пирувата. При визуализации комплексов антиген-антитело флуоресцентными зондами с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии выявлено уменьшение пиков флуоресценции в эритроцитах В(III) группы крови после преинкубации с пируватом по сравнению с эритроцитами в контроле (рис. 3). Эти данные полностью соответствуют

результатам, полученным с помощью метода гемагглютинации и проточной цитометрии. В случае А(II) группы крови вместо явного увеличения содержания комплексов антиген-антитело, обнаруженного методом проточной цитофлуориметрии, обнаружено даже небольшое уменьшение их содержания, что соответствует результатам гемагглютинации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Показано, что пируват может регулировать интенсивность взаимодействия антигена с антителом. Преинкубация эритроцитов с пируватом приводит к уменьшению экспонирования антигенов А и В на поверхности эритроцитов или к изменению их конформации, что вызывает уменьшение скорости гемагглютинации и снижение количества комплексов антиген-антитело в эритроцитах всех групп крови. При этом внесение пирувата к моноклональным антителам перед началом

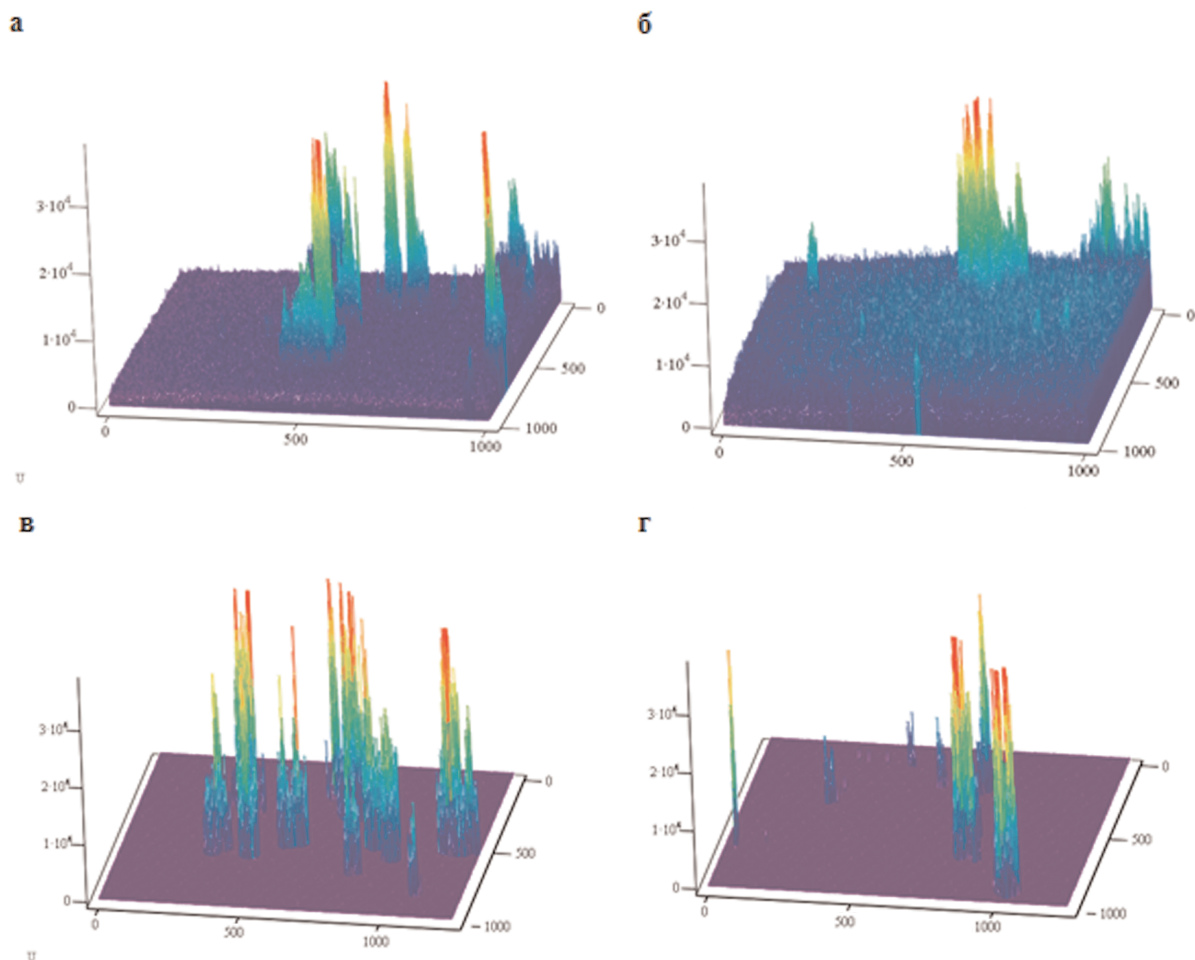


Рисунок 3. Диаграммы пространственного распределения интенсивностей флуоресценции FITC в комплексах антиген-антитело. (а) контрольные эритроциты А(II) группы крови; (б) эритроциты А(II) группы крови после инкубации с пируватом; (в) контрольные эритроциты В(III) группы крови; (г) эритроциты В(III) группы крови после инкубации с пируватом.

их взаимодействия с антигенами эритроцитов А(II) и В(III) группы крови оказывает противоположный эффект вызывая ускорение гематглютинации.

С использованием компьютерной системы "PASS" предсказана способность пирувата оказывать гиперхолестеролемическое, иммуномодулирующее, противовоспалительное, обезболивающее, фибринолитическое, цито- и гемопротекторное, антиоксическое действия.

Предложена наглядная молекулярная модель для изучения межбелковых взаимодействий. Использование естественных интермедиатов в качестве молекулярных зондов позволяет выяснить биологические эффекты данных соединений и характер регулируемых ими молекулярных взаимоотношений. Данная модель может быть рекомендована для тестирования широкого спектра веществ, обладающих биологической и фармакологической активностью.

Сведения о влиянии пирувата на характер антиген-антительного взаимодействия, лежащего в основе иммуноферментного и иммунохемилюминесцентного анализа, важны при интерпретации результатов лабораторных исследований, что обуславливает необходимость оценки индивидуального метаболического статуса пациента.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (в рамках реализации проекта 13-04-9712 "Модель визуализации белок-белкового взаимодействия").

ЛИТЕРАТУРА

1. Гильмиярова Ф.Н., Радомская В.М., Гергель Н.И. и др. (2007) Группы крови: биологическая вариабельность клеточного состава и метаболизма в норме и патологии, Изд-во "Известия", Москва.

2. Yamamoto F., McNeil P.D., Yamamoto M. et al. (1993) VoxSang., **64**, 171-174.
3. Гармонов С.Ю., Евгеньев М.И., Зыкова И.Е. (2004) Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, №1, 3-4.
4. Донсков С.И., Мороков В.А. (2011) Группы крови человека. Руководство по иммуносерологии, Изд-во Скороходов В.А., Москва.
5. Чхиквадзе В.Д., Танаян А.О. (2007) Вопросы онкологии, **3**, 311-314.
6. Lomenick B., Olsen R.W., Huang J. (2010) Chem. Biol., **6**, 34-46.
7. Льюис С.М., Бэйн Б., Бэйтс И. (2009) Практическая и лабораторная гематология. Пер. с англ. под ред. А.Г. Румянцев. ГЭОТАР – Медиа, Москва.
8. Минеева Н.В. (2004) Группы крови человека. Основы иммуногематологии, СПб.
9. Оловникова Н.И., Николаева Т.Л. (2001) Гематология и трансфузиология, №5, 37-45.
10. Донсков С.И. (2001) Гематология и трансфузиология, **46**(5), 32-33.
11. Сахаров Р.С., Кондратова И.В., Федюлова М.В., Гургенидзе Е.В. (2001) Судебно-медицинская экспертиза, **5**, 38-43.
12. Smolarek D., Krop-Watorek A., Wasniowska K., Czerwinski M. (2008) Postepy Hig. Med. Dosw. (online), **62**, 4-17.
13. Marsh W.L. (1972) Transfusion, 352-353.
14. www.way2drug.com/passonline
15. Kuger G. (1980) Lactate Physiol. and Pathol. Approach Berlin, **5**, 224-229.
16. Бойко Т.К. (1983) Содержание метаболитов и активность ферментов в участках сопряжения углеводного и липидного обменов при атеросклерозе. Автореферат дис. канд. мед. наук, Куйбышев, 23.
17. Малинка М.К., Петриев В.М., Подгородниченко В.К. (2007) Иммунология, №1, 16-19.
18. Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. (2000) Иммунология, Изд-во Медицина, Москва.

Поступила: 16. 08. 2013.

**MODELING ROLE OF PYRUVATE IN THE PROCESSES
OF PROTEIN-PROTEIN INTERACTION**

*F.N. Gylmiyarova¹, V.M. Radomskaya¹, O.A. Gusyakova¹, E.A. Ryskina², N.A. Kolotyeva¹,
E.A. Shahnovich¹, N.S. Nefedova¹, G.M. Baisheva¹, Yu.Y. Pervova¹, A.P. Pleten³*

¹Samara state medical university,
89 Chapaevskaya str., Samara, 443099 Russia; tel.: (846)3370463, e-mail: bio-sam@yandex.ru

²Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

³A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

Using the ABO antibody-antigen model the influence of natural metabolite pyruvate on the antibody interaction with of erythrocyte antigens, defining their group specificity has been investigated. Before agglutination reaction erythrocytes of A(II)-AB(IV) blood groups, monoclonal anti-A and anti-B antibodies were incubated with sodium pyruvate. Visualization of agglutinates was performed by means of flow cytometry and laser scanning confocal microscopy. Computer-aided prediction of the spectrum of biological activity of pyruvate by a PASS program proposed major regulatory pathways, in which pyruvate may be involved. It has been demonstrated that pyruvate can regulate the intensity of antigen-antibody interaction. These results suggest the possibility of using small molecules, for example pyruvate, as molecular probes and prospects of the use of erythrocytes with antigenic determinants of the ABO system expressed on their membranes for studies of protein-protein interactions due to convenient visualization and possibility of quantitative evaluation of this process.

Key words: protein-protein interactions, ABO antigens, monoclonal antibodies, pyruvate, confocal microscopy.