Взаимодействия фармакологически значимых ферментов с гликозаминогликанами в представлениях биомолекулярных структур

А.В. МАКСИМЕНКО

Институт экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, Москва, Россия

Продemonстрировано интенсивное использование вычислительных методов для исследования взаимодействий ферментов с другими соединениями организма. Отмечена значимость такого подхода и увеличивающийся интерес исследователей к изучению воздействия гликозаминогликановых лигандов на фармакологически значимые биокатализаторы методами молекулярного докинга. Полученные с его помощью данные способствуют раскрытию механизмов наблюдаемых взаимодействий, развитию приемов управления активностью ферментов и обоснованию целенаправленных рекомендаций по разработке новых терапевтических средств высокомолекулярной природы. Показаны результаты выполнения молекулярного докинга с гепараназой, хондроитиназой ABC I, хондроитиназой B, гиалуронидазой. Представлен подход к рациональному дизайну молекул соединений, регулирующих активность ферментов, для разработки новых лекарственных производных направленного действия. Обсуждены перспективы расчетных методов для исследования комплексообразования гликозаминогликанов с белками.

Ключевые слова: молекулярный докинг, ферменты, углерод — кислород — лиазы, гликозидазы, гликозаминогликаны, гепараназа, хондроитиназа ABC I, хондроитиназа B, гиалуронидаза, информационные технологии, цифровизация.

Interactions of molecular structures of pharmacologically significant enzymes with glycosaminoglycans for elicitation of their mechanism action and design of novel drug derivatives

A.V. MAKSIMENKO

Institute of Experimental Cardiology of National Medical Research Center for cardiology, Moscow, Russia

Intense using of computational methods for enzyme interaction study with other compounds of organism is demonstrated. Importance of such approach and increasing interest of researchers to glycosaminoglycan ligand reaction on pharmacologically significant biocatalysts with molecular docking methods is noted. Obtained with its help data contribute the disclosure of observe interaction mechanism, development of enzyme activity control and grounding of rational recommendations for novel therapeutic means development of high-molecular kind. The results of molecular docking of heparanase, chondroitinase ABC, chondroitinase B, and hyaluronidase were shown. The approach to rational design of molecules of compounds regulating enzyme activity for novel drug derivative development of directional action is representative. The perspectives of computational methods for glycosaminoglycan with enzyme complexon is discuss.

Keywords: molecular docking, enzymes, carbon oxygen lyases, glycosidases, glycosaminoglycans, heparanase, chondroitinase ABC I, chondroitinase B, hyaluronidase, informative technology, digitizing.

Сведения об авторах:

Максименко Александр Васильевич — д. б. н., проф., руководитель группы биоинженерной химии, ведущий научный сотрудник отдела биоинженерных технологий и поддержки научных исследований Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России; e-mail address: alex.v.maks@mail.ru; тел.: +7 (495) 414-60-25; факс: +7 (499) 726-31-16

Введение

Набирающее популярность в настоящее время использование методов вычислительной химии отличает интенсивность теоретического изучения белок-гликозаминогликановых комплексов. Гликозаминогликаны

(ГАГ), входящие в состав эндотелиального гликокаликса, выступают вместе с самим эндотелием двойным защитным слоем сосудистой системы [1]. Гликокаликс подвергается поражению еще на начальных стадиях нарушений кровообращения, что подчеркивает его значимость для выявления дисфункции сосудистой стенки и как терапевтической мишени для блокирования, ликвидации и предупреждения таких ее патологических

изменений [2]. Интересно заметить, что ГАГ предстают единственной биомолекулой, для которой специфические и неспецифические взаимодействия обязательны для осуществления их бесчисленных функций [3]. ГАГ располагаются снаружи, внутри и на клетках, демонстрируя свою молекулярную разноразмерность по длине (маловероятную для любых других биомолекул), пространственную и временную динамику. Более того, яркой особенностью предстают предлагаемое ГАГ химическое пространство и информация, которые на несколько порядков величин больше, чем у других биополимеров (хотя не все из этих последовательностей ГАГ могут существовать в природе) [3]. Предположительно, размер ГАГ зависит от состава звеньев и не зависит от изменения последовательности [4]. Звенья идуроновой кислоты (IdoA) увеличивают объем и жесткость ГАГ-цепи, тогда как глюкуроновая кислота (GlcA) ухудшает ее пластичность. Вероятно, поэтому блок-сополимерные ГАГ, такие как гепарансульфат, содержат микроархитектурные элементы для мультивалентного связывания с факторами роста и коллагеном [4]. Следует отметить, что молекулярно-динамическое моделирование применительно к большим системам (как биомолекулы) или к длинным/протяженным шкалам времени (вплоть до мкс) вполне обычно использует расчет величин энергии и сил взаимодействия исходя из классических механических силовых полей [5]. При редких переходах между ротамерными состояниями моделирование молекулярной динамики используется при временах свыше 100 нс или с повышенным апробированием для достижения сходимости данных. Изучение взаимодействия ферментов, расщепляющих ГАГ (это могут быть, согласно классификации ферментов, как гликозидазы, так и углерод-кислород-лиазы), с гликозаминогликановыми соединениями вычислительными методами продемонстрировало интересные результаты пока только для низкомолекулярных лигандов (из-за ограниченности разрешения применяемого программного обеспечения).

Расчетные методы для конструирования новых лекарственных средств высокомолекулярной структуры

Возможность ликвидации и блокирования отмеченных выше поражений сосудистой стенки разрабатываемыми биохимическими средствами [6] повышает значимость методов вычислительной химии в конструировании новых лекарственных производных высокомолекулярной природы. Одна из современных тенденций биохимической и молекулярной инженерии — переход от представлений *in silico* к производству новых продуктов, неуклонное движение биофармацевтической индустрии к анализу и использованию предсказательного моделирования [7]. К новому уровню производительности труда ведет цифровизация экономики, в Европе интенсивно развиваются цифровые биотехнологические фабрики. В Российской Федерации разработана и принята программа «Цифровая экономика России», реализация которой рассчитана до 2024 г. Развитие и внедрение в России цифровой экономики, одним из направлений которой предстают научные

исследования и разработки, способствует независимости Российской Федерации в мировой экономической системе при ее переходе на новую глобальную модель, которая сопровождается уже не одной волной цифровизации. На нынешнем этапе цифровая экономика — это оптимизация и автоматизация производственных, интеллектуальных процессов, сокращение издержек, рутины, бюрократии, а вовсе не подавление традиционной экономики и не альтернатива налаживанию инфраструктуры общества: «старая» и «новая» рабочая сила не будут жестко конкурировать на рынке труда. В списке приоритетных направлений развития России наука располагается рядом с цифровой экономикой. Конечно, важно рационально использовать выделенные финансовые средства. Мы заметно отстаем от лучших мировых стандартов. Однако широта развития цифровой экономики, включающей научные исследования, молодой возраст кадрового ресурса исполнителей цифровизации способствуют сокращению имеющегося отставания и заметному приближению к лидерам этой области. Компьютеризация вычислительных методов молекулярных взаимодействий способствует раскрытию их механизмов и обоснованному созданию новых лекарственных средств, в частности посредством молекулярного докинга ферментов с гликозаминогликановыми лигандами [8].

Молекулярный докинг — теоретический альтернативный экспериментальному метод изучения взаимодействий структур биомолекул с компонентами их микроокружения. Он (докинг) выступает расчетным инструментом предсказания и моделирования/имитации предпочтительной ориентации (в нашем случае) ГАГ (и/или их фрагментов) и белковых молекул (с вычислением минимальной величины энергии для связывания лиганда на молекулярной поверхности белка). Далее рассмотрены конкретные случаи выполнения молекулярного докинга биокатализаторов с ГАГ для регуляции ферментативной активности.

Докинг углерод-кислород-лиаз и гликозидаз с гликозаминогликановыми лигандами

Гепараназа человека расщепляет гепарансульфат протеогликан экстрацеллюлярного матрикса и базальной мембраны, освобождая гепарин/гепарансульфатные олигосахариды. Отмеченное действие этого фермента вызывает выделение факторов роста, которые способствуют ускорению развития опухоли и метастазирования. Такое обстоятельство непременно повышает актуальность поиска ингибиторов гепараназы. Методом гомологичного моделирования была построена 3D-структура гепараназы человека для выявления ингибиторов фермента и дизайна антираковых средств [9]. Последнее обусловлено тем, что стимуляция синтеза и освобождения гепараназы (она продуцируется нормальными и опухолевыми клетками) может повышать инвазию и метастазирование. Опухолевые клетки могут замедляться и блокироваться специфическими ингибиторами гепараназы. Различные ГАГ-ингибиторы были докированы с гепараназой, чтобы определить, какие аминокислотные остатки в белке взаимодействуют с сульфатированными сахарадами [10]. Отдельно от элек-

тростатических взаимодействий с гепарин-связывающими доменами гидрофобные взаимодействия также дают вклад в повышение аффинности связывания некоторых ГАГ-ингибиторов. Выполненный докинг определяет существование большого связывающего центра, простирающегося, по крайней мере, на два сахаридных звена после центра расщепления (в направлении невосстанавливающего конца) и как минимум на три сахара в направлении восстанавливающего конца (в сторону гепарин-связывающего центра 2). Полученные результаты обосновывают подход к рациональному дизайну молекул соединений (ингибирующих гепариназу) для разработки антираковых лекарств, нацеленных на два гепарин-/гепарансульфатраспознающих домена [10]. Данные докинга потенциального ингибитора ронепарстата (Roneparstat, неантикоагулянтный 100% N-ацетилированный и глиоксаль-расщепленный гепарин) с гепараназой человека продемонстрировали взаимодействие одной молекулы ронепарстата как с одним из двух гепарин-связывающих доменов гепариназы, так и взаимодействие фермента с двумя фрагментами ронепарстата (из двух его разных молекул) или с гепарин-связывающим доменом 1 или 2, согласующимися с возможностью различной стехиометрии фермент-ингибиторного связывания [11].

Хондроитиназа ABC I является ГАГ-деполимеризующей лиазой, действие которой может изменять химическую структуру ГАГ, что способствует антиопухолевой активности, ингибированию ангиогенеза и опухолевого метастазирования [12]. Приобретает актуальность знание механизма катализа хондроитиназой ABC I. Методом молекулярного докинга конструировали комплексы хондроитиназы ABC I с субстратами (хондроитинсульфатом и дерматансульфатом). Субстраты размещали внутри построенного активного центра фермента с применением модели его кристаллической структуры. Модифицированное силовое поле AMBER было использовано для определения потенциала как белка, так и его тетрасахаридных субстратов. Начальная структурная модель фермент-субстратного комплекса была подвергнута минимизации энергии. При этом большая часть молекулы белка была фиксирована, и только аминокислотам, являющимся частью набора активного центра фермента, было разрешено двигаться в течение минимизации. Этой процедурой кольцевая конформация моносахарида не разрушалась. Были определены четыре структурно консервативных аминокислоты: His-501, Tyr-508, Arg-560 и Glu-653, вовлеченные в осуществление каталитической активности хондроитиназы ABC I. Низкоэнергетические фермент-субстратные комплексы получали методами системной минимизации энергии, где аминокислотам активного центра и субстратам было разрешено свободно двигаться. Неблагоприятные стерические контакты устранялись минимизацией начальной энергии, чтобы получить хорошую стартовую структуру фермент-субстратного комплекса. Эта структура в дальнейшем была подвергнута минимизации общей энергии для достижения локальной минимальной энергии исследуемого комплекса [12]. Его модель предполагает, что аминокислоты

активного центра фермента более благоприятно расположены для расщепления хондроитинсульфата, чем дерматансульфата.

Единственным ГАГ-субстратом хондроитиназы В выступает дерматансульфат [13]. Определение точной роли аминокислотных остатков активного центра фермента затруднено наличием широкой полосы pH-оптимума его активности. В изучении докинга был использован тетрасахарид дерматансульфата. Начальную ориентацию его структуры относительно хондроитиназы В получали наложением невосстанавливающего конца тетрасахарида на дисахарид в сокристаллической структуре хондроитиназы В с дисахаридным продуктом деградации дерматансульфата. Для манипуляций применяли модули докинга INSIGHT II и модифицированное для включения углеводного силового поля AMBER. Для дальнейшей минимизации энергии была выбрана оптимальная ориентация тетрасахаридного субстрата в активном центре фермента с малыми стерическими затруднениями. Выполнение докинга и минимизации энергии приводит к репозиционированию тетрасахаридного субстрата для достижения максимальных контактов с щелью активного центра фермента. В финальной ориентации тетрасахарид полностью занимает его субцентры -2, -1, +1 и +2 [13].

Ферментативная активность гиалуронидаз направлена на деградацию гиалуронана (единственного несulfатированного ГАГ эндотелиального гликокаликса) и с меньшей эффективностью на хондроитин и хондроитинсульфат [14]. Выполнение молекулярного докинга 3D-модели фермента с тримерами (гексасахаридами) хондроитинсульфата и тетрамерами (октасахаридами) гепарина продемонстрировало наличие на молекулярной поверхности бычьей тестикулярной гиалуронидазы восьми центров связывания, свободная энергия присоединения лигандов по которым, по крайней мере, в два раза превышает энергию лигандов в свободном состоянии [15]. Оценка конформационной подвижности гиалуронидазы (до температуры денатурации) опиралась на ее заметную доменную устойчивость. Время динамики при моделировании определяли, как уже упоминалось [9, 15], в ходе конформационных изменений [16]. Если изменение величины энергии с учетом флуктуаций, зависящих от температуры, выходит на плато, то проведение расчета можно прекращать. Если же изменение энергии происходит и дальше, тогда процедура вычислений продолжается, пока не будет достигнуто новое плато. Для докинга гиалуронидазы эти интервалы времени составили 100 пс, и их оказалось 15 [15]. Через 1,2 нс устанавливалось новое плато. Обратимость/необратимость конформационных изменений бычьей тестикулярной гиалуронидазы определяли по возвращению к исходному структурному состоянию за установленный интервал времени (50–100 пс), что свидетельствовало о стабильности белка (т. е. об отсутствии конформационных колебаний, обусловленных тепловым движением). Доминирующей причиной отмеченных взаимодействий фермента с ГАГ-лигандами были электростатические силы. Изопотенциальная поверхность (т. е. поверхность, образованная точками простран-

Рисунок 1. Вид изопотенциальной поверхности по уровню 0,3 е/ао (окрашена зеленым цветом) свободной молекулы бычьей тестикулярной гиалуронидазы. Потенциалы выражены в натуральной системе атомных единиц е/ао (где е — заряд электрона, а ао — радиус Бора). В системе СИ 0,75 В примерно соответствует величине потенциала 0,3 е/ао

ства, где потенциал электрического поля равен 0,3 е/ао) свободной гиалуронидазы (изоповерхности по уровню 0,3 е/ао, **рис. 1**) заметно изменялась по форме после взаимодействия с пятью хондроитинсульфатными лигандами (**рис. 2**), обуславливая значимые структурные перестройки молекулы фермента.

Следует отметить, что на весьма отдаленном расстоянии от ферментной молекулы потенциал электрического поля равен нулю. Физический смысл этого понятия заключается в величине энергии, которую нужно затратить, чтобы из бесконечности доставить в данную точку один протон. Изоповерхности, проходящие вблизи или внутри

Рисунок 2. Иллюстративное представление изопотенциальной поверхности (по уровню 0,3 е/ао, окрашена зеленым) молекулы бычьей тестикулярной гиалуронидазы с пятью хондроитин-сульфатными лигандами. Взаимодействие гиалуронидазы с хондроитинсульфатными лигандами происходит по центрам связывания cs1, cs2, cs3, cs4, cs6 на белке [15]

молекулы, обычно негладкие и меняют знак, приближаясь к заряженным атомам, а отдаленные от нее снаружи — гладкие и, как правило, одного знака. Изучение изменений электрического поля с варьированием вида лигандов на молекуле гиалуронидазы, развития при этом других стабилизирующих фермент взаимодействий, проведение селективной модификации биокатализатора по установленным в исследовании центрам на белковой поверхности, выявление наиболее эффективных стабилизаторов и инактиваторов белка обосновывают задачи дальнейшего изучения, направленного на определение закономерностей регуляции функционирования гиалуронидаз.

Таким образом, под действием электростатических взаимодействий ГАГ-лигандов с 3D-моделью гиалуронидазы происходят обратимые и необратимые конформационные изменения фермента, что может вызывать как его стабилизацию, так и инактивацию. Определение достоверных рекомендаций модификации биокатализатора указывает путь получения его стабилизированных форм медицинского назначения.

Вычислительные подходы в изучении комплексообразования ГАГ с белками

Расчетные методы активно используются для изучения взаимодействия ГАГ с белками. Соотношение «структура — функция ГАГ» демонстрирует специфичность их комплексообразования с белками, такими как факторы роста, антитромбин, цитокины, молекулы клеточной адгезии [17]. Сложность ГАГ-белковых взаимодействий обусловлена конформационной гибкостью и основными видами сульфатирования ГАГ, ролью ионов металлов и влиянием pH среды на аффинность связывания. Для понимания механизма этих явлений вычислительно моделируют взаимодействия ГАГ с белками, связывающие ГАГ-белковые центры, 3D-структурные особенности ГАГ. Отмеченные аспекты актуальны для выявления клинической значимости ГАГ. Успешность разработки ГАГ-лекарственных средств определяется формированием соотношения между структурой ГАГ и природой их взаимодействия с разными белками. Расчет свободной энергии связывания гепариновых фрагментов разной длины с тромбоцитарно-эндотелиальной молекулой адгезии 1 (PECAM-1) обнаружил существование области низкоаффинного связывания ГАГ в доменах PECAM-1 5 и 6, области высокоаффинного связывания на доменах 2 и 3, согласующихся с экспериментальными данными и результатами изучения лиганд-белкового докинга [18]. Наблюдалось движение между доменами 2 и 3, которое способствует связыванию фрагментов гепарина возрастающего размера (от пентасахарида к октасахариду) с увеличивающейся аффинностью связывания. В общем, расчеты свободной энергии показали, что связывание гепарина к белковой поверхности определяется доминированием сильных электростатических взаимодействий для более длинных фрагментов лигандов наряду с важным вкладом вандерваальсовых взаимодействий и изменений вибрационной энтропии с противодействием неблагоприятному вкладу десольватации (благодаря высокой

плотности зарядов этих молекул). Комбинируя выполнение докинга с кластерным анализом для определения адекватных структур докинга из многих возможных, использовали программу AutoDock 3.0 для связывания основного фактора роста фибробластов с гепарином [19]. Минимизация энергии связывания посредством программы AMBER8, как и расчеты по AutoDock 3.0, не были удовлетворительны сами по себе, чтобы выбрать комплекс со связанным гепарином среди полученных структур. Большинство из них (созданное с помощью AutoDock 3.0) было явно близко к другим по атомной геометрии и по усредненной геометрии близко к таковой в кристаллической форме комплексов. Точное предсказание гепарин-связывающих структур этих белков (основного фактора роста фибробластов, антитромбина, аннексина V) показывает эффективность использованного в изучении подхода для проведения докинга лигандов с варьирующимися конформациями благодаря наличию множества ротационных связей и заряженных химических групп [18]. Два предположительно гепарин-связывающих пептида были идентифицированы вблизи C- и N-концевых областей проматрилизина (матриксной металлопротеиназы 7 — ММР-7). Вместе с тем молекулярное моделирование предполагает наличие более обширного участка связывания или полости из множества пересекающихся пептидных полос/нитей [20]. Связывание фермента ММР-7 через гепарин/гепарансульфат с клеточной поверхностью способствует его прямым протеолитическим атакам, активации других ММР или регуляции поверхностных клеточных белков. Выполненное изучение подчеркивает важность заякоревания ММР на клеточной поверхности для регуляции процессов тканевого ремоделирования [20]. Эффективным инструментом исследования упомянутых выше процессов предстают методы молекулярного докинга и молекулярной динамики.

Современное развитие компьютерных технологий

Движение биофармацевтической индустрии в сторону анализа и использования предсказательного моделирования, составляя одну из современных тенденций биохимической и молекулярной инженерии, базируется на переходе от представлений in silico к производству новых продуктов [7]. В эпоху глобализации общества такие тренды пронизывают все области человеческой деятельности. Цифровая экономика выступает важным аспектом национальной безопасности, существенно сокращая путь от проекта до производства, от нее зависит глобальная конкурентоспособность государства. Цифровая диверсификация активно развивается по разным отраслям экономики (от машиностроения до фармацевтики) [8]. Развитие медицины сегодня связано с поэтапным и повсеместным вхождением в клиническую практику информационных технологий. Новые требования к развитию здравоохранения, стремительное расширение области применения и генерации компьютерных технологий ставят перед создателями программного обеспечения задачу разработки и выпуска комплексных систем автоматизации диагностики, мониторинга, лечения и профилактики заболеваний. Продвижение структурных научных исследований высокомолекулярных терапевтических производных оказывается в русле современных биомедицинских направлений, способствуя выяснению механизма действия таких средств и целенаправленному конструированию и разработке высокоэффективных лекарственных препаратов нового поколения.

Настоящее изучение выполнено при финансовой поддержке РФФИ (грант 18-015-00056) и Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Maksimenko A.V. Эндотелиальный гликокаликс — настройщик сосудистого гомеостаза. Новые исследовательские задачи и перспективы защиты стенки кровеносных сосудов. *Изв. АН. Сер. Хим.* 2015; 64 (9): 2036-2042. [Maksimenko A.V. Endothelial glycocalyx as an orchestrator of vascular homeostasis. New research problems and prospects for vessel wall protection. *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.* 2015; 64 (9): 1-7].
2. Maksimenko A.V. Молекулярные аспекты трансляционной кардиологии в исследованиях сосудистой стенки. *Кардиология.* 2017; 57(7): 66-79. [Maksimenko A.V. Molecular aspects cardiology in vascular wall research. *Kardiologija.* 2017; 57(7): 66-79. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.18087/cardio.2017.7.10008>
3. Sankaranarayanan N.V., Nagarajan B., Desai U.R. So you think computational approaches to understanding glycosaminoglycan — protein interactions are too dry and too rigid? Think again! *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2018; 50: 91-100. <http://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.12.004>
4. Almond A. Multiscale modeling of glycosaminoglycan structure and dynamics: current methods and challenges. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2018; 50: 58-64. <http://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.11.008>
5. Woods R.J., Tessier M.B. Computational glycoscience: characterizing the spatial and temporal properties of glycans and glycan-protein complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2010; 20: 575-583.
6. Maksimenko A.V. Translational research into vascular wall function: regulatory effects of systemic and specific factors. *J. Transl. Sci.* 2017; 3 (2): 1-10. Doi: 10.15761/JTS.1000180
7. Maksimenko A.V. Results and achievements in the engineering of pharmacological enzymes for clinical application. *Med. Res. Arch.* 2018; 6 (1): 1-13. <http://journals.ke-i.org/index.php/mra>
8. Maksimenko A.V. Приближение исследований фармакологических ферментов нового поколения к клинической практике. *Кардиол. Вестник.* 2018; XIII (4): 41-49. [Maksimenko A.V. Approximation of new generation pharmacological enzyme researches to clinical practice. *Kardiologicheskij Vestnik.* 2018; XIII (4): 41-49. <https://doi.org/10.17116/Cardiobulletin20181304141>]
9. Zhou Z., Bates M., Madura J.D. Structure modeling, ligand binding, and binding affinity calculation (LR-MM-PBSA) of human heparanase for inhibition and drug design. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.* 2006; 65 (3): 580-592.
10. Gandhi N.S., Freeman C., Parish C.R., Mancera R.L. Computational analysis of the catalytic and heparin-binding sites and their interactions with glycosaminoglycans in glycoside hydrolase family 79 endo- -D-glucuronidase (heparanase). *Glycobiology.* 2012; 22 (1): 35-55. Doi: 10.1093/glycob/cwr095
11. Pala D., Rivara S., Mor M., Milazzo F.M., Roscilli G., Pavoni E., Giannini G. Kinetic analysis and molecular modeling of the inhibition mechanism of roneparstat (SST0001) on human heparanase. *Glycobiology.* 2016; 26 (6): 640-654. Doi:10.1093/glycob/cww003
12. Prabhakar V., Raman R., Capila I., Bosques C.J., Pojasek K., Sasisekharan R. Biochemical characterization of the chondroitinase ABC I active site. *Biochem. J.* 2005; 390 (Pt.2): 395-405. Doi:10.1042/BJ20050532

13. Pojasek K., Raman R., Kiley P., Venkataraman G., Sasisekharan R. Biochemical characterization of the chondroitinase B active site. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 31179-31186. Doi:10.1074/jbc.M201552200
14. Maksimenko A.V., Бибилашвили Р.Ш. Влияние гиалуронидазного микроокружения на соотношение структура-функция фермента и вычислительное исследование in silico молекулярного докинга гиалуронидазы с короткими фрагментами хондроитинсульфата и гепарина. *Изв. АН. Сер. Хим.* 2018; 67 (4): 636-646. [Maksimenko A.V., Beabealashvili R.S. Effect of the hyaluronidase microenvironment on the enzyme structure-function relationship and computational study of the in silico molecular docking of chondroitin sulfate and heparin short fragments to hyaluronidase. *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.* 2018; 67 (4): 1-11.
15. Maksimenko A.V., Бибилашвили Р.Ш. Конформационные переходы на 3D-модели бычьей тестикулярной гиалуронидазы при молекулярном докинге с гликозаминогликановыми лигандами. *Биоорган. Химия.* 2018; 44 (2): 147-157. [Maksimenko A.V., Beabealashvili R.S. Conformational transitions in 3D model of bovine testicular hyaluronidase during molecular docking with glycosaminoglycan ligands. *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2018; 44 (2): 144-151. Doi: 10.1134/S1068162018020048]
16. Maksimenko A.V., Beabealashvili R.S. Molecular docking of short-chain glycosaminoglycan ligands in 3D model of bovine testicular hyaluronidase. *Curr. Res. Bioorgan. Organ. Chem., CRBOC-111.* 2018; 2018 (2): 6 pages. Doi:10.29011/CRBOC-111.100011
17. Gandhi N.S., Mancera R.L. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem. Biol. Drug Des.* 2008; 72: 455-482. Doi:10.1111/j.1747-0285.2008.00741.x
18. Gandhi N.S., Mancera R.L. Free energy calculations of glycosaminoglycan-protein interactions. *Glycobiology.* 2009; 19 (10): 1103-1115. Doi: 10.1093/glycob/cwp101
19. Takaoka T., Mori K., Okimoto N., Neya S., Hoshino T. Prediction of the structure of complexes comprised of proteins and glycosaminoglycans using docking simulation and cluster analysis. *J. Chem. Theory Comput.* 2007; 3 (6): 2347-2356. Doi:10.1021/ct700029q
20. Wei-Hsuan Y., Woessner J.F. Jr. Heparan sulfate proteoglycans as extracellular docking molecules for matrilysin (matrix metalloproteinase 7). *J. Biol. Chem.* 2000; 275 (6): 4183-4191.

Поступила 25.01.2019.

Принята в печать 18.02.2019.