

На правах рукописи

КОЛОТЬЕВА
Наталья Александровна

МАЛЫЕ МОЛЕКУЛЫ – ПЕРЕКЛЮЧАТЕЛИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Краснодар, 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор
Гильмиярова Фрида Насыровна.

Официальные оппоненты:

Салмина Алла Борисовна, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научный центр неврологии", отдел исследований мозга, главный научный сотрудник;

Никулина Дина Максимовна, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра биологической химии, заведующая кафедрой;

Бородулин Владимир Борисович, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра биохимии, заведующий кафедрой.

Ведущая организация: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится 25 мая 2021 г. в 09.00 на заседании диссертационного совета Д 208.038.02 на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России) (350063, г. Краснодар, ул. Митрофана Седина, 4, тел. (861)2625018).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и официальном сайте (<http://www.ksma.ru>) ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета Д 208.038.02
доктор медицинских наук,
доцент



Лапина Наталья Викторовна

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В последние годы все больше внимания уделяется малым молекулам – соединениям с молекулярной массой от 40 до 1000 Да - которые могут изменять содержание метаболитов и их потоки в путях промежуточного метаболизма, что может регулировать специфичные межмолекулярные процессы. Малые молекулы составляют большинство клеточных молекул, их внутриклеточные концентрации варьируют в широком диапазоне, и они участвуют в самых разнообразных молекулярных превращениях [Ф.Н. Гильмиярова с соавт., 2013; H.M. Wilkins, R.H. Swerdlow, 2016; B. Zhang et al., 2018; S. Li, W. Shui, 2020; T. Tsukidate et al., 2020]. Благодаря прогрессу на сегодняшний день мы имеем большой объем данных о количестве образующихся белков в организме, однако, имеется недостаточное количество информации о том, как малые молекулы регулируют функции белка посредством межмолекулярного связывания, что формирует потребность в фундаментальных исследованиях и является актуальным изучение роли метаболитов – переключателей обмена веществ.

Мы обратили наше внимание на малые молекулы, находящиеся в точке пересечения метаболических путей обмена белков, жиров, углеводов, структурно-функциональный потенциал которых обеспечивает многочисленные биомолекулярные процессы. В частности, дигидроксиацетонфосфат является окислительно-восстановительным партнером глицерофосфата, играет важную роль в углеводно-липидном метаболизме. При недостатке энергии молекула диоксиацетонфосфата продолжает свой путь в гликолитическом процессе, при достаточном количестве энергии может вступать на путь биосинтеза липидов [Y. Mugabo et al., 2016; E. Possik et al., 2017]. Многочисленные метаболические и неметаболические функции этих переключателей обеспечиваются тонкой регуляцией с помощью глицерофосфатдегидрогеназы. Было показано, что митохондриальная глицерофосфатдегидрогеназа ускоряет окисление глюкозы, стимулируя выработку ацетил-кофермента А, ацетилирование гистонов и индукцию генов, кодирующих медиаторы воспаления в макрофагах, способствует онкогенезу в клетках глиомы [P.K. Langston et al., 2019; J. Lu et al., 2020]. Исследование глицерофосфатдегидрогеназы представляет собой терапевтическую цель для лечения и механизмах, регуляции онкологических заболеваний [C. Zhou et al., 2017; P.Rusu et al., 2019; F. Lorenzetti et al., 2020].

Одним из важнейших промежуточных компонентов метаболизма и источником энергии для митохондрий является пируват, обладающий антиоксидантным, цитопротективным и противовоспалительным действиями, участвует в процессах ремоделирования клеточного матрикса, может использоваться в качестве терапевтического средства для коррекции

гипоксического лактацидоза [S.Hu et al., 2016; S. Xia et al., 2016; Y.Wang et al., 2018; I. Elia et al., 2019]. Лактат, образующийся благодаря действию лактатдегидрогеназы, является не «тупиком» метаболизма, а энергетическим субстратом, который образуется в тканях с ускоренным гликолизом, может влиять на экспрессию генов, выступать в качестве нейротекторного фактора, сигнальной молекулы – «лактормон». Лактирование остатков лизина ядерных белков служит эпигенетической модификацией, которая стимулирует транскрипцию генов, что свидетельствует о роли лактата в патофизиологических состояниях, включая инфекционные и злокачественные процессы [G.A.Brooks, 2016; M. Zhang et al., 2018; D. Zhang et al., 2019]. По литературным данным, лактатдегидрогеназа играет важную функцию не только в активном метаболизме, но и ключевую роль в клинической диагностике различных распространенных и редких заболеваний, является противоопухолевой мишенью [D. Deme et al., 2017; S. Mansouri et al., 2017; M.D. Banerjee et al., 2019; A.A.Khan et al., 2019].

Оксалоацетат является «точкой пересечения» многих метаболических путей обмена белков и углеводов. Благодаря его центральной роли в энергетическом обмене, оксалоацетат был назван биоэнергетическим лекарственным препаратом, специально разработанным для повышения уровня энергии клеток, обладает протективным, промитохондриальным действиями, препятствует нейровоспалению, нероидегенерации. В промежуточном обмене стоит отметить ферментативные превращения малата, обеспечиваемые малатдегидрогеназой, в связи с ключевым положением данного метаболита в цикле трикарбоновых кислот, малат-оксалоацетатном цикле, а также его важной ролью в биохимической адаптации организма к гипоксии, поддержании жизнедеятельности организма в целом. Клинический интерес к данному ферменту обусловлен в качестве диагностического маркера при онкологических и нейродегенеративных заболеваниях [E. Kanamori et al., 2015; F. Qiang, 2015; Y.X. Lu et al., 2018; M. New et al., 2019; I.Zerr et al., 2019].

Таким образом, количество и качество вышеперечисленных метаболитов способствует переключению углеводно-липидного и липидно-углеводного, углеводно-белкового и белково-углеводного обменов (рисунок 1). Доступность этих малых молекул, которая обеспечивается действием каталитических белков, может регулировать энергетический и промежуточный обмен веществ, клеточный окислительно-восстановительный потенциал и выработку АТФ, определяя приоритетное для клетки в данный момент времени направление метаболизма. Особый интерес при изучении взаимодействий метаболит - белок представляют те, которые могут выявить новые фермент-субстратные взаимоотношения и случаи индуцированного метаболитами ремоделирования

белковых комплексов [K. Bingol et al., 2016; S. Solier et al., 2020; A. Kuusk et al., 2020].

Сведения, получаемые из областей геномики, транскриптомики, протеомики и метаболомики, в настоящее время интегрируются в понятие паномика с целью улучшения нашего понимания биохимии, патофизиологии, диагностики и лечения. Будущее медицины - это то, где данные из разных областей науки используются для создания диагностических инструментов, которые все больше учитывают генетическую и метаболическую изменчивость каждого человека. Конечной целью будет быстрая диагностика заболевания с применением точной прецизионной медицины с использованием подходов биоэнергетической и митохондриальной медицины [C. Sandhu et al., 2018; K.E. Weck, 2018; P. Belenguer et al., 2019; A.J. Angelbello et al., 2020].

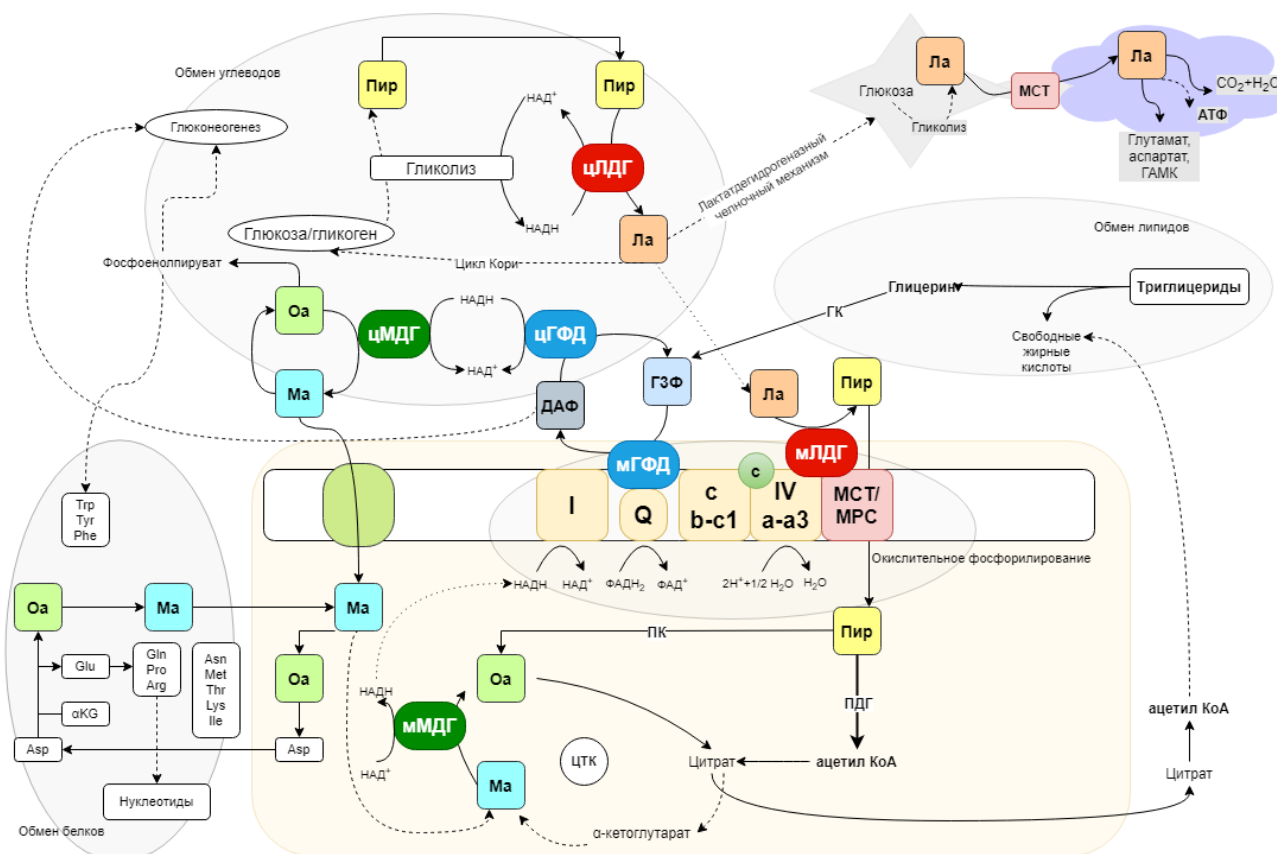


Рисунок 1 – Роль малых молекул в обмене веществ (авторский рисунок)

Настоящее исследование выполнено в рамках Федеральной программы (номер государственной регистрации 0120.0809698) «Взаимодействие биологически активных веществ растительного и животного происхождения с системами жизнедеятельности организма с учетом биологической вариабельности метаболизма, ассоциированной с групповой принадлежностью крови».

Степень разработанности темы исследования. Метаболиты составляют бóльшую часть молекул в клетках, но наши знания о взаимодействии метаболит-белок отстают от нашего понимания взаимодействий белок-белок или белок-ДНК. Единичные публикации об изучении взаимодействия белков с малыми молекулами начали появляться только в 2009 году [X. Li et al., 2013; I. Piazza et al., 2018]. Последние современные технологические достижения позволили изучить несколько платформ с высокой пропускной способностью, чтобы выявить многие «неожиданные» взаимодействия белка с метаболитами, которые могут оказать глубокое влияние на наше понимание передачи сигналов клетками. В последние годы были построены обширные сети взаимодействия, чтобы описать, как каждый белок связывает ДНК, РНК и белок [E.L. Van Nostrand et al., 2016; E.A. Ryskina et al., 2016; K. Rooijers et al., 2019; Q. Xu et al., 2020].

Ожидается, что документирование и интерпретация взаимодействий между метаболитами и белками в биологическом контексте будут важны для здоровья человека и медицины, помогая исследователям понять молекулярную основу здоровья и патологических состояний. В частности, регуляторы метаболитов, связанных с изменениями структуры белков, могут обеспечить новые стратегии для потенциальных терапевтических вмешательств [R. Liu et al., 2016; Y. Wang et al., 2018].

Изучение малых молекул на сегодняшний день представляется актуальной задачей, поскольку, имея совсем небольшую молекулярную массу, они оказывают множественные влияния не только на метаболизм в целом, но и на системы межклеточного взаимодействия, и остается достаточное количество нерешенных задач о функционировании, транспорте, регулировании передачи сигнала, воспалительного ответа и межмолекулярном взаимодействии этих интермедиатов. Однако, имеющуюся сегодня информацию нельзя назвать исчерпывающей, что все еще оставляет широкий простор для научной мысли и новых исследований, которые, безусловно, необходимы не только с позиции фундаментальной науки, но и новейших подходов современной медицины: таргетная терапия, в частности, онкологических заболеваний, индивидуальная метаболическая карта для персонализированной прецизионной медицина, что может сыграть существенную роль для биоэнергетической и митохондриальной медицины [M. Picard, 2016; W. Wang et al., 2016; F.N. Gilmiyarova et al., 2016; E.A. Рыскина с соавт., 2017; S. Chen et al., 2020].

Цель исследования: изучить влияние естественных метаболитов на белок-белковые, фермент-субстратные взаимодействия и охарактеризовать регуляторные возможности малых молекул - пирувата, лактата, оксалоацетата, малата.

Задачи исследования:

1. Провести прогнозирование *in silico* биологических свойств пирувата, лактата, оксалоацетата, малата в программе PASS и определить их потенциальных белковых партнеров взаимодействия в системе STITCH
2. Изучить особенности влияния малых молекул на белок-белковые взаимодействия с последующей разработкой межмолекулярной модели групповой принадлежности крови по АВ0 системе.
3. Визуализировать и количественно оценить взаимодействия гликопротеинов А и В и анти-А, анти-В антител в условиях действия пирувата и лактата методом агглютинации и с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.
4. Изучить влияние пирувата, лактата, оксалоацетата, малата в сравнительном аспекте на конформацию и термоллабильность глицерофосфатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы методами микроскопического термофореза и дифференциальной сканирующей флуориметрии.
5. Выявить особенности действия малых молекул в различном диапазоне концентраций на функциональную активность глицерофосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы.
6. Изучить влияние пирувата, лактата, оксалоацетата и малата на метаболический профиль и жизнеспособность, оценивая пролиферативные свойства клеточной культуры дермальных фибробластов.

Научная новизна. Новыми являются данные об особенностях межмолекулярного взаимодействия белков группы крови АВ0 и антител при влиянии малыми молекулами пируватом и лактатом. Показано, что антиген А более активно вступает в реакции с малыми молекулами, чем антиген В, что, очевидно, обусловлено различием в строении антигенных детерминант и способностью пирувата и лактата оказывать модифицирующее влияние на межмолекулярные взаимодействия (патент №2484480 от 10.06.2013 «Способ оценки действия биологически активных веществ на антиген-антительное взаимодействие»; патент №2680408 от 21.02.2019 «Способ выявления влияния низкомолекулярных биологически активных веществ на аффинитет белок-лигандной связи»).

Нами был использован новый подход для визуализации белковых комплексов в условиях влияния молекул с небольшой молекулярной массой с использованием лазерной сканирующей микроскопии с последующей количественной оценкой результатов взаимодействий (заявка на патент 2020116810 от 25.05.2020 «Способ выявления влияния низкомолекулярных биологически активных соединений на взаимодействие антиген-антитело»).

Впервые было изучено влияние малых молекул (пирувата, лактата, оксалоацетата, малата) на конформацию каталитических белков (лактатдегидрогеназы и глицерофосфатдегидрогеназы) в модельных экспериментах *in vitro* с применением метода микрокапиллярного термофореза. Были описаны равновесные константы диссоциации для взаимодействующих веществ.

Впервые для изучения конформационных особенностей каталитических белков под влиянием различных концентраций малых молекул в температурном градиенте был использован метод дифференциальной сканирующей флуориметрии. Было выявлено, что оксалоацетат, малат, лактат и пируват в малых концентрациях вызывают термостабилизирующее действие на структуру белка лактатдегидрогеназы, и глицерофосфатдегидрогеназы, в высоких концентрациях снижают термостабильность ферментов (патент на изобретение № 2698628 от 28.08.2019 «Способ выявления влияния низкомолекулярных биологически активных веществ на конформацию белка»).

Было выявлено дозозависимое влияние оксалоацетата и малата на функционирование лактатдегидрогеназной системы. Миллимолярные концентрации малых молекул ингибируют функцию лактатдегидрогеназы, микромолярные концентрации оказывают активирующее действие на активность каталитического белка.

Новыми являются полученные данные метаболического профиля супернатанта и лизата клеток фибробластов при культивировании с пируватом, лактатом, оксалоацетатом и малатом, а также их влияние на жизнеспособность клеточной культуры. Показано стимулирующее действие оксалоацетата и малата на клеточную культуру дермальных фибробластов человека, что выражалось в изменении показателей метаболического профиля и активности ферментов в надосадочной жидкости и лизате клеток, увеличении параметров жизнеспособности клеток.

Теоретическая и практическая значимость работы:

1. Методами компьютерного моделирования с использованием системы PASS выявлен широкий спектр прогнозируемой биологической активности пирувата, лактата, малата, оксалоацетата, с помощью программы STITCH определены белковые партнеры взаимодействия изучаемых малых молекул, что свидетельствует о возможности малых молекул оказывать регуляторное воздействие на белковые структуры.

2. Выявлено влияние пирувата и лактата на белок-белковое взаимодействие гликопротеинов А и В, анти-А, анти-В антител молекулярной модели групп крови АВ0. Установлено удлинение времени вступления во взаимодействие белковых структур с углеводными компонентами N-ацетилгалактозамина: А А(II) на 40% ($p < 0,001$), гликопротеина А АВ(IV) на 51,6% ($p < 0,0001$),

преимущественно с лактатом, пируват в меньшей степени замедлял образование комплексов.

3. Проведен количественный анализ белковых комплексов после инкубации с пируватом и лактатом, и их визуализация с использованием конфокальной микроскопии. Определили усиление процесса агрегации гликопротеина А, что выражается в увеличении числа комплексов, их площади и средней интенсивности пикселя, при этом эффект лактата выражен сильнее, чем пирувата ($p=0,01$). Выявлено уменьшение числа образованных комплексов гликопротеина В, их площади и средней интенсивности пикселя.

4. Равновесные константы диссоциации для взаимодействующих веществ, полученные методом микрокапиллярного термофореза, показывают сродство лактата к молекуле глицерофосфатдегидрогеназы и более слабый аффинитет связи к другим малым молекулам – пирувату, оксалоацетату, малату. Окислительно-восстановительная пара лактат и пируват, которые являются субстратами для лактатдегидрогеназы проявили максимально высокое сродство к молекуле белка, по сравнению с парой малатом и оксалоацетатом.

5. Выявлено изменение конформационной структуры глицерофосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы при влиянии пируватом, лактатом, оксалоацетатом, малатом. Конечные концентрации 0,5-1 мкМ биологически активных соединений увеличивают термостабильность каталитических белков, 16 мкМ концентрации снижают термостабильные свойства.

6. Определено влияние изучаемых интермедиатов на фермент-субстратное взаимодействие глицерофосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы при постановке серии экспериментов *in vitro*. Миллимолярные концентрации оксалоацетата и малата ингибируют функцию лактатдегидрогеназы, микромолярные концентрации оказывают активирующее действие на активность каталитического белка.

7. С использованием технологии клеточной культуры установлено влияние малых молекул на пролиферативные свойства дермальных фибробластов человека. Оксалоацетат на 27,3% ($p=0,019$) и малат на 33,8% ($p=0,028$) увеличивают жизнеспособность культуры клеток дермальных фибробластов, что находит свое отражение в изменении содержания метаболитов и активности ферментов. Лактат запускает прооксидантные процессы, снижая процент жизнеспособных клеток на 67,6% ($p=0,005$), что приводит к характерному изменению метаболитного профиля.

Методология и методы диссертационного исследования. Диссертационная работа носит фундаментальный, экспериментальный характер. Используются биохимические, иммунологические, спектрометрические методы исследования, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, дифференциальная

сканирующая флуориметрия, капиллярный термофорез, культура клеток, а также статистические методы обработки данных. Работа включала несколько этапов:

- компьютерное моделирование прогнозируемой биологической активности в программе Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS) и определение потенциальных белковых партнеров взаимодействия для малых молекул в системе Search Tool for Interacting Chemicals (STITCH)
- анализ функционирования модели антиген–антитело системы АВ0 крови под влиянием естественных метаболитов;
- визуализация белок-белкового взаимодействия методом конфокальной микроскопии и количественная оценка влияния малых молекул на белковые комплексы;
- изучение конформационных особенностей каталитических белков под влиянием температурного фактора в присутствии малых молекул с применением методов дифференциальной сканирующей флуориметрии, микроскопического термофореза;
- оценка функционирования фермент-субстратной системы при влиянии малыми молекулами в различном диапазоне концентраций.
- культура клеток фибробластов при культивировании с пируватом, лактатом, оксалоацетатом, малатом

Основные положения, выносимые на защиту:

1. С использованием компьютерной платформы PASS установлен широкий спектр биологической активности пирувата, лактата, оксалоацетата, малата; с использованием системы STITCH определены потенциальные партнеры взаимодействия.

2. Для изучения влияния биологически активных соединений на белок-белковое взаимодействие разработана молекулярная модель. Показано, что антиген А более активно вступает в реакции с малыми молекулами, чем антиген В, что, очевидно, обусловлено способностью пирувата и лактата оказывать модифицирующее влияние на межмолекулярные взаимодействия. Установлено, что лактат проявляет себя с большей биологической активностью, в отличие от пирувата, удлиняя время вступления во взаимодействие белковых структур с углеводными компонентами N-ацетилгалактозамина А(II) и АВ(IV) групп.

3. Визуализация и количественная оценка белковых комплексов в условиях действия лактата и пирувата с применением конфокальной микроскопии показала влияние малых молекул на гликопротеин А, что проявляется в усилении процесса агрегации, увеличении числа комплексов, их площади и средней интенсивности пикселя по зеленому цвету. Наблюдается ингибиторный эффект метаболитов на гликопротеин В, что связано с

уменьшением числа образованных комплексов, их площади и средней интенсивности пикселя по зеленому цвету в режиме флуоресценции.

4. Равновесные константы диссоциации для взаимодействующих веществ, полученные методом микрокапиллярного термофореза, показывают сродство лактата к молекуле глицерофосфатдегидрогеназы и более слабый аффинитет связи к другим малым молекулам – пирувату, оксалоацетату, малату. Лактат и пируват, которые являются субстратами для лактатдегидрогеназы проявили высокое сродство к молекуле белка, по сравнению с оксалоацетатом и малатом.

5. Изменение конформации лактатдегидрогеназы и глицерофосфатдегидрогеназы под влиянием пирувата, лактата, оксалоацетата, малата с применением дифференциальной сканирующей флуориметрии. Малые концентрации биологически активных соединений увеличивают термостабильность каталитических белков, высокие концентрации снижают термостабильные свойства.

6. Выявлено дозозависимое влияние малата и оксалоацетата на функциональную активность лактатдегидрогеназы. Миллимолярные концентрации малых молекул ингибируют функцию каталитического белка, микромолярные концентрации оксалоацетата и малата оказывают активирующее действие.

7. Естественные интермедиаты оксалоацетат и малат увеличивают жизнеспособность культуры клеток дермальных фибробластов, что находит свое отражение в изменении содержания метаболитов и активности ферментов. Лактат запускает прооксидантные процессы, снижая процент жизнеспособных клеток, что приводит к характерному изменению метаболитного профиля.

Степень достоверности и апробация работы. Диссертационное исследование выполнено с применением информативных методов, на достаточном количестве исследований, с применением адекватной статистической обработки с помощью пакета компьютерных программ SPSS 21 (IBM SPSS Statistics, USA) и Excel 2016, что обосновывает достоверность результатов работы, выводов и рекомендаций.

Результаты исследований были представлены на международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: геномика, протеомика, биоинформатика» (Новосибирск, 2011), Всероссийской научно-практической конференции биохимиков и специалистов по лабораторной медицине (Омск, 2011), Всероссийской конференции с международным участием «Молодые ученые – медицине» (Самара, 2011), II международной интернет-конференции «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии» (Казань, 2011), XVII Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине» (Казань, 2012), XVI международной научной конференции

«Здоровье семьи в XXI веке» (Венгрия, Будапешт, 2012), III международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: геномика, протеомика, биоинформатика» (Казань, 2012), XVI международной научной конференции «Здоровье семьи в XXI веке» (Португалия, Лиссабон, 2013), Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых специалистов с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева» (Рязань, 2016), V съезде физиологов СНГ, V съезде биохимиков России, конференция ADFLIM (Сочи, Дагомыс, 2016), научно-практической конференции с международным участием "Научные достижения молодых ученых XXI века в рамках приоритетных направлений стратегии научно-технологического развития страны" (Самара, 2017), XV международной научно-практической конференции «Наука в современном информационном обществе» (США, North Charleston, 2018), V международной конференции «Постгеном 2018» (Казань, 2018), международной ежегодной конференции «Saratov fall meeting 2019» (Саратов, 2019), II объединенном научном форуме VI съезд физиологов СНГ, VI съезд биохимиков России, IX Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Сочи, Дагомыс, 2019), XVII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов, посвященной 75-летию Южно-Уральского государственного медицинского университета (Челябинск, 2019), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 90-летию профессора А.Ш. Бышевского и Р.И. Лифшица «Медицинская биохимия – от фундаментальных исследований к клинической практике. Традиции и перспективы» (Тюмень, 2019), совместном заседании коллективов кафедр фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой, общей и молекулярной биологии, детских болезней, Научно-исследовательского института гигиены, Института экспериментальной медицины и биотехнологий ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава РФ (Самара, 2020).

Публикации по теме диссертации. Всего по материалам диссертации опубликовано 43 работы, в том числе 19 – в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий или входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, и издания, приравненные к ним, в том числе 7 работ в изданиях, индексируемых в базах данных Scopus и WoS, и 3 патента РФ.

Внедрение результатов исследования. Результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе на кафедре фундаментальной и

клинической биохимии с лабораторной диагностикой, кафедре общей и молекулярной биологии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава РФ, а также нашли практическое применение в работе клинко-диагностических лабораторий клиник ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава РФ, ГБУЗ СОКБ им. В.Д. Середавина, Институте экспериментальной медицины и биотехнологий ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава РФ.

Личный вклад автора состоял в постановке научных задач, научно-информационном поиске и анализе литературных данных, формулировке цели. Проведение компьютерного моделирования с использованием систем PASS и STITCH позволило определить биологическую активность пирувата, лактата, оксалоацетата, малата, а также подобрать партнеров взаимодействия. Лично автором проведены экспериментальные работы *in vitro* по оценке влияния малых молекул на белок-белковые взаимодействия, изолированные каталитические белки глицерофосфатдегидрогеназу и лактатдегидрогеназу, функционирование фермент-субстратных систем глицерофосфатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, системы ферментов малатдегидрогеназа – лактатдегидрогеназа, клеточную культуру фибробластов. Участие автора более 85 % в сборе и обработке литературных источников, данных компьютерного моделирования и экспериментов. Самостоятельно проведено обобщение и анализ полученных материалов, статистическая обработка результатов, написан текст диссертации и иллюстративный материал, сформулированы выводы, а также внедрение в практику результатов диссертационной работы.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 297 страницах машинописного текста и состоит из введения, 6 глав, заключения и списка литературы, иллюстрирована 31 таблицей и 38 рисунками. Указатель литературы содержит 453 источника, из которых 51 отечественный и 402 зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились на кафедре фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет», в клинко-диагностической лаборатории Клиник ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, в лаборатории молекулярной и радиационной биофизики Петербургского университета ядерной физики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», на кафедре радиотехнических устройств ФГБОУ ВПО «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева», Институте экспериментальной медицины и биотехнологий ФГБОУ ВО «Самарский

государственный медицинский университет» Минздрава РФ. Дизайн исследования представлен на рисунке 2.

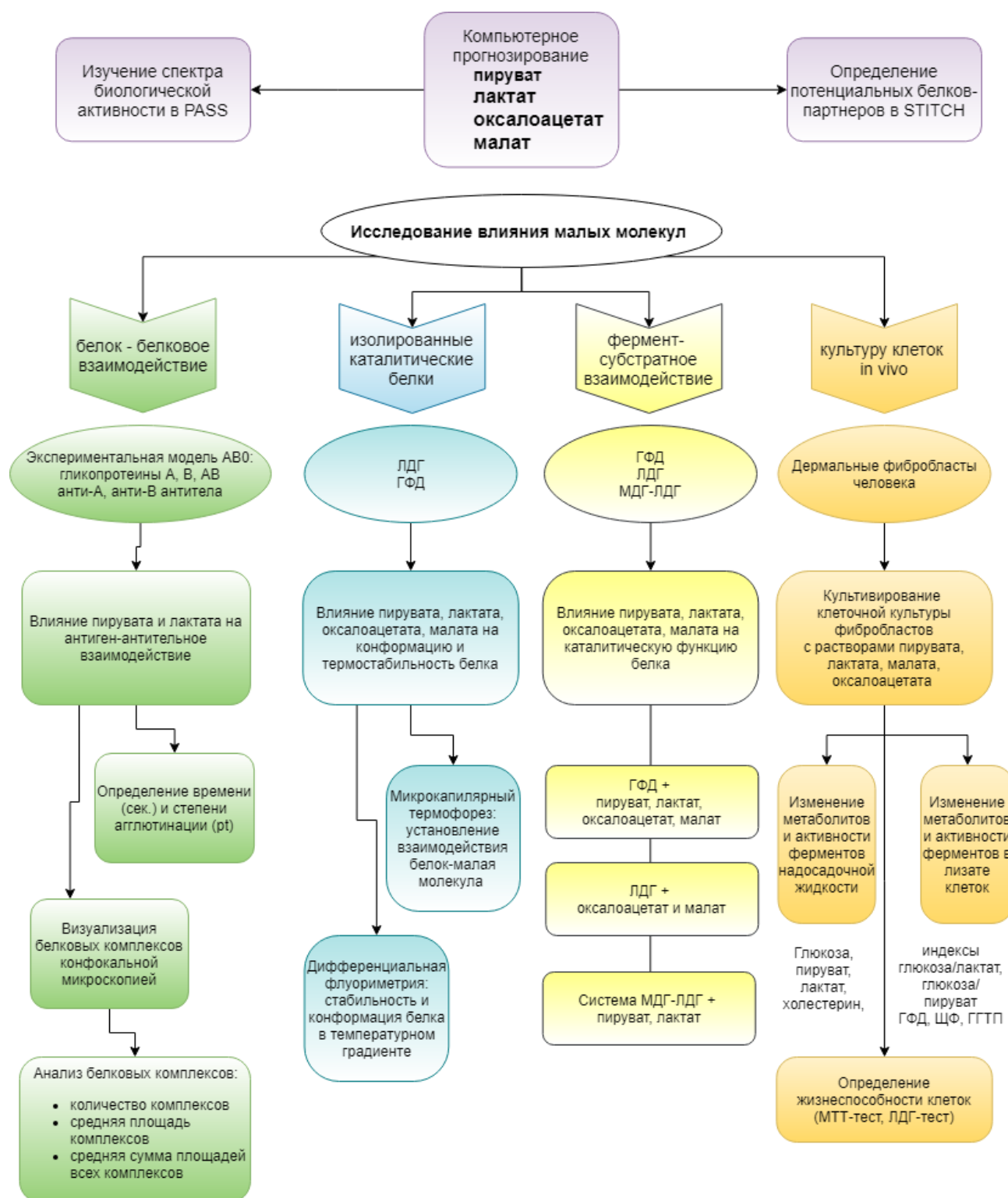


Рисунок 2 – Дизайн исследования

Моделирование прогнозируемой биологической активности *in silico* пирувата, лактата, оксалоацетата, малата проводили в программе Prediction of Activity Spectra for Substances. Определение потенциальных белковых партнеров взаимодействия для малых молекул выполняли в системе Search Tool for Interacting Chemicals версии 5.0.

Определение групповой принадлежности крови по системе АВ0 проводили перекрестным методом с использованием моноклональных антител анти-А, анти-В, анти-АВ (Гематолог, Россия) и стандартных эритроцитов 0(I), А(II), В(III) групп (ГБУЗ СОК СПК, Россия) и на автоматическом иммуногематологическом анализаторе Hemos SP II (Bio-Rad, США), с использованием набора коммерческих реактивов Trans Clone (Bio-Rad, США).

В качестве модели для изучения белок-белкового взаимодействия использовали систему АВ0 групп крови (патент № 2484480 от 10.06.2013). Инкубировали антигены А и В, естественные антитела с раствором пирувата (2 мМ) и лактата (2 мМ). Конечные концентрации и время инкубации 5 минут были подобраны эмпирически. На первом этапе 100 мкл эритроцитов (антигены А и В) инкубировали с 20 мкл раствором малых молекул, затем проводили прямую агглютинацию с моноклональными анти-А, анти-В антителами. Затем, 100 мкл плазмы (анти-А, анти-В антитела) инкубировали с 20 мкл раствором малых молекул 5 минут, далее проводили реакцию агглютинации со стандартными эритроцитами. В качестве контрольных проб использовали постановку агглютинации антигенов А и В II, III, IV групп крови с моноклональными антителами без малых молекул. Учитывали время наступления (в секундах) и степень выраженности (pt) агглютинации от 0 до 12 с использованием методики бальной оценки [W.L Marsh., 1972].

Визуализацию белковых комплексов, инкубированных с малыми молекулами пируватом и лактатом осуществляли с использованием конфокального оптического микроскопа (Olympus, Япония). Использовали режимы основного рассеивания и флуоресценции. Обработка полученных микроснимков проводилась в программе JMicroVision 1.2.7. Оценивались конгломераты агглютинатов (критерием служило наличие более 2-х эритроцитов в комплексе) на микроснимках основного рассеивания, рассчитывалась площадь комплексов в квадратных микрометрах и процент, занимаемый одним комплексом в кадре. На флуоресцентных микрофотографиях выделяли весь кадр с флуоресцирующими комплексами, рассчитывали среднюю интенсивность пикселей кадра по зеленому цвету.

В экспериментальной работе использовали каталитические белки лактатдегидрогеназа (ЕС 1.1.1.27); глицерофосфатдегидрогеназа (ЕС 1.1.1.8) (Sigma-Aldrich, США). Применение микрокапиллярного термофореза позволяет определить наличие комплексов белок – малая молекула и силу взаимодействия

между ними, благодаря изменению их подвижности в температурном градиенте. Эксперименты проводились на приборе Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies, Германия). Мечение каталитических белков глицерофосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы проводили с использованием коммерческого набора Monolith NT Protein Labeling Kit RED-NHS (NanoTemper Technologies, Германия). С целью определения константы диссоциации (K_d) методом микротермофореза делали серию постановок с малыми молекулами оксалоацетатом, малатом, пируватом и лактатом в конечной концентрации от 0,0012 мкМ до 40 мкМ (16 разведений), а конечная концентрация меченного белка была постоянной и подбиралась эмпирически: 0,8 мкМ для глицерофосфатдегидрогеназы; 1,65 мкМ для лактатдегидрогеназы.

Определение изменения конформационной структуры глицерофосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы под влиянием пирувата, лактата, оксалоацетата, малата проводили с использованием дифференциальной сканирующей флуориметрии, основанной на изменении собственной флуоресценции триптофана и тирозина белков при длине волны 330 и 350 нм на приборе Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies, Германия). Конформационную стабильность белка описывали его средней температурой денатурации T_m (°C), которая является точкой, где разворачивается половина белка. Готовили шесть разведений, в которых конечная концентрация глицерофосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы была неизменной - 1 мкМ, а конечная концентрация растворов лактата, пирувата, оксалоацетата и малата изменялась - 0,5 мкМ, 1 мкМ, 2 мкМ, 4 мкМ, 8 мкМ, 16 мкМ, сканировали капилляры при интенсивности лазера 30%, диапазон нагрева от 20°C до 95°C, шаг 1°C /мин. Было проанализировано влияние диапазона концентраций оксалоацетата, пирувата, лактата, малата на соотношение флуоресценций лактатдегидрогеназы (350/330 нм) в физиологическом диапазоне температур (36,5-37,5 °C). Контроль значения pH проводили до и после внесения растворов исследуемых малых молекул в пробы с помощью pH-метра Mettler Toledo (США). Изменение pH среды имело колебания в пределах 0,01-0,02.

Установление функционирования глицерофосфатдегидрогеназной, лактатдегидрогеназной, малат- лактатдегидрогеназной каталитических систем под влиянием пирувата, лактата, малата, оксалоацетата в диапазоне концентраций 0,01 мкМ - 5 мМ проводили на автоматическом биохимическом анализаторе Cobas Integra 400plus (Roche Diagnostics, Швейцария). Конечные концентрации малых молекул были подобраны эмпирически и разводились *ex tempore*. Готовили опытную (фермент с малой молекулой) и контрольную пробы. Каталитические белки с растворами интермедиатов инкубировали при

комнатной температуре 25°C в течение 5 минут, старт реакции начинался на борту анализатора. Во всех образцах определяли содержание белка методом пирогаллоловым красным. Производили расчет удельной активности фермента на мг белка, выражали Е/мг белка.

Влияние малых молекул на клеточную культуру фибробластов оценивали путем добавления растворов пирувата, лактата, оксалоацетата, малата в конечной концентрации 1,5 мМ к клеткам в дозе 2×10^4 клеток /см², инкубировали 120 часов в CO₂-инкубаторе MCO-17AI (Sanyo, Япония) при 37°C в атмосфере CO₂. Лактат, пируват, малат, оксалоацетат, разводили 10 мМ фосфатным буфером pH=7,4. После подготовки раствора малых молекул проводился контроль pH с помощью pH-метра Mettler Toledo (США). Для каждого соединения эксперименты были выполнены в 4 повторях. Контролем служили культуральная среда фибробластов, инкубированных без малых молекул и полная культуральная среда (среда 199 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 40 мкг/мл гентамицина).

Определение биохимических показателей (холестерин, глюкоза, лактат, пируват) и активности ферментов (гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТП), щелочная фосфатаза (ЩФ), глицерофосфатдегидрогеназа (ГФД), лактатдегидрогеназа (ЛДГ)) проводили в супернатанте культуральной жидкости и лизате клеток на автоматическом биохимическом анализаторе Cobas Integra 400plus (Roche Diagnostics, Швейцария) реактивами Roche Diagnostics.

Жизнеспособность клеток определяли с применением МТТ-теста, принцип которого заключается в восстановлении тетразолиевых солей оксидоредуктазными ферментами митохондрий в пурпурные кристаллы формазана. Оптическую плотность определяли с применением мультиридера Tecan Infinite M200 PRO (Tecan Austria GmbH, Австрия), длина волны 570 нм.

ЛДГ-тест проводили в культуральной жидкости после ее центрифугирования (оценивался лизис клеток) и лизате прикрепленных клеток (оценивалось количество жизнеспособных клеток), затем рассчитывали процент погибших клеток от общего количества лизированных и жизнеспособных клеток. Использовали спектрофотометр СФ-56 (ЛОМО-Спектр, Россия), длина волны 340 нм.

Статистическую обработку данных проводили в пакете прикладных программ SPSS 12.0 (IBM SPSS Statistics, США), предварительные подсчеты в программе MS Excel 2016. Использовали параметрические и непараметрические методы статистического анализа. Находили среднее (M), ошибку среднего (m), стандартное отклонение (SD), 95% доверительный интервал (95% ДИ). Межгрупповые сравнения проверяли с помощью t-критерия Стьюдента для двух независимых выборок, для трех и более групп

применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Критическое значение уровня значимости принимали равным 0,05.

Для данных, имеющих не нормальное распределение, использовали анализ медианы (Me), нижнего и верхнего квартиля, квартильного размаха. Сравнение внутри отдельных групп проводили с применением критерия Манна-Уитни-Вилкоксона - ранг-тест для парных выборок, для сравнения трех и более выборок использовали непараметрический дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса.

Использование графического метода позволило оценить форму распределения исследуемых показателей, анализировали показатели скошенности и крутизны, отражающие асимметрию распределения, а также тесты на нормальность с помощью критерия Колмогорова-Смирнова с поправкой Лилиефорса и Шапиро-Уилки.

Для оценки влияния пирувата, лактата, оксалоацетата, малата на конформацию каталитического белка лактатдегидрогеназы при 36,5-37,5°C использовали сравнение различных концентраций малых молекул, с помощью дисперсионного анализа с последующими апостериорными сравнениями с контролем и попарные сравнения всех разведений по критерию Даннетта.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В более ранних работах нами была смоделирована в компьютерном обеспечении PASS и оценена биологическая активность, молекулярные механизмы и оказываемые фармакологические эффекты малых молекул пирувата и лактата по отдельности. [Н.А. Колотьева, 2012; Н.А. Колотьева с соавт., 2016; Ф.Н. Гильмиярова с соавт., 2016; 2017]. Нами был изучен прогнозируемый спектр биологической активности пирувата, лактата, малата и оксалоацетата с использованием компьютерной системы PASS (рисунок 3).

Обращает на себя внимание наличие способности у лактата и пирувата влиять на клеточные процессы, выступать в качестве цитопротекторов, стимуляторов лейко- и эритропоэза, агрегации тромбоцитов, ингибиторов тромбопоэза и адгезии тромбоцитов, вероятно, за счет способности активировать сигнальный путь, индуцируемый гипоксией фактор-1 (HIF-1 α) - эритропоэтин (EPO) [Y.Wang et al., 2018]. Изучаемые естественные интермедиаты оказывают противовоспалительное, антиишемическое действия, повышают сократительную способность сердца и энергетическое состояние миокарда, укрепляют эндогенные антиоксидантные системы и защищают ткани от окислительного стресса благодаря усилению саркоплазматического ретикулярного транспорта Ca²⁺, увеличения продукции НАДН для поддержания окислительно-восстановительного состояния глутатиона [R.T. Mallet, 2018].

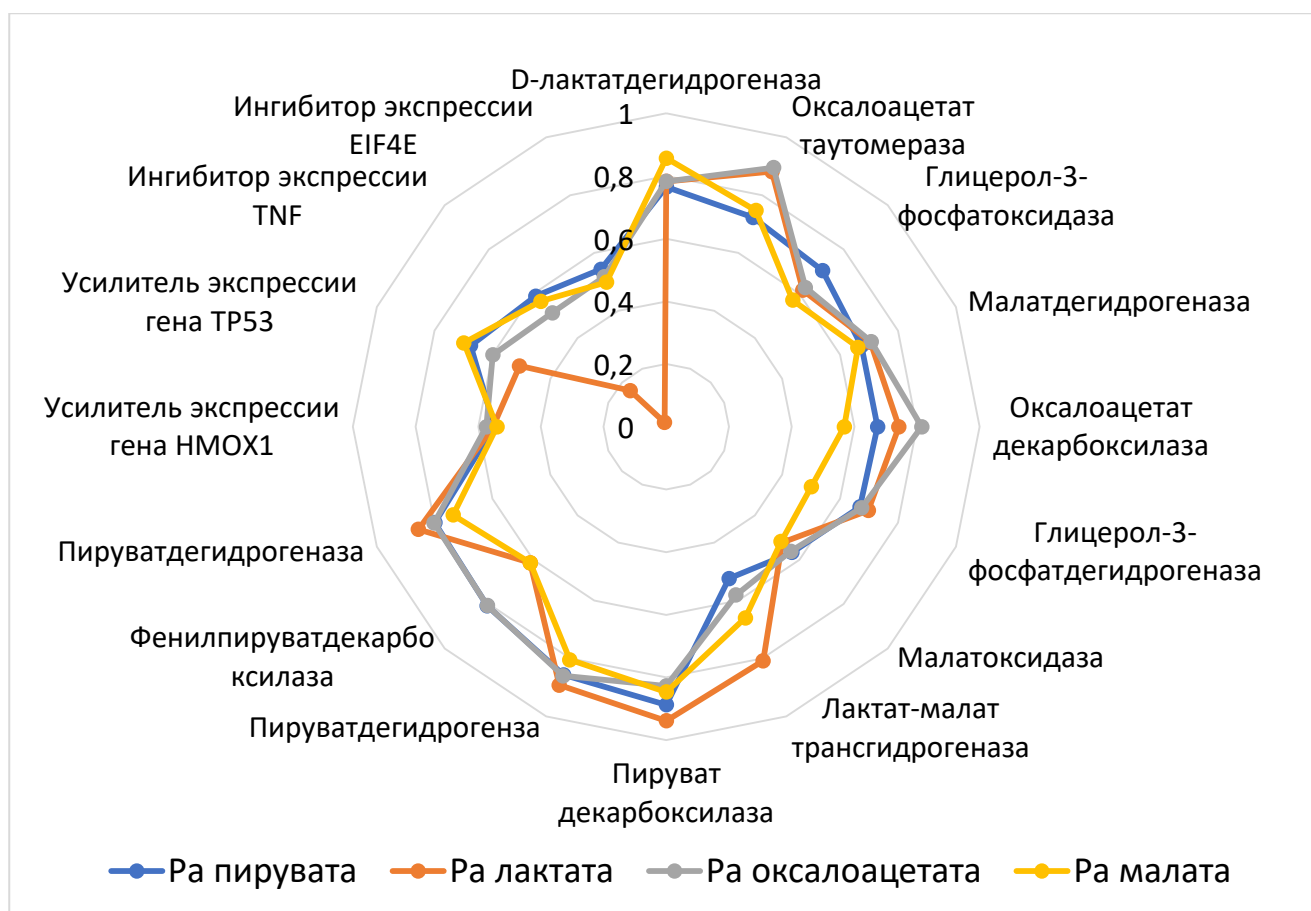


Рисунок 3 – Смоделированные свойства малых молекул в отношении ингибции ряда ферментов и экспрессии генов

Интересными являются полученные сведения в отношении ингибиторных свойств изучаемых биологически активных соединений для ряда ферментов: пируватдегидрогеназы, пируватдекарбоксилазы, лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, глицерол-3-фосфатдегидрогеназы и других.

Далее мы обратились к поисковому инструменту - программе STITCH, в которой можно произвести компьютерное моделирование потенциальных белковых партнеров, с которыми могут взаимодействовать изучаемые малые молекулы. При использовании среднего порога достоверности $p > 0,4$ количество взаимодействий для пирувата составило 109, лактата - 384, малата - 120, оксалоацетата - 61. Отмечаются взаимодействия исследуемых малых молекул с белками, в том числе альбумин, перфторин 1, альфа-фетопротейн, цитохром b5, мускариновыми холинэргическими, дофаминовыми, серотониновыми, глутаматными рецепторами, белками-переносчиками, в частности белки семейства транспортёров растворённых веществ – SLC25, SLC16, SLC5; митохондриальным переносчиком пирувата 1 и 2 типов – MPC1, MPC2, гормонами (адреналин, соматостатин, мелатонин), ферментами (малатдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, фумаратгидратаза, пируваткиназа и многие другие). Полученные в программе

STITCH данные согласуются с предсказанным системой PASS различными молекулярными механизмами действия и фармакологическими эффектами пирувата, лактата, оксалоацетата и малата.

Проведенный анализ большого массива данных компьютерного моделирования с использованием таких платформ как PASS и STITCH позволило сформировать общее представление о разнообразных и разнонаправленных эффектах, межмолекулярных и регуляторных механизмах действия изучаемых малых молекул. Таким образом, естественные интермедиаты являются промежуточными соединениями метаболизма, точками пересечения многих метаболических путей обмена белков, углеводов, липидов, выполняют вместе с тем координационную роль в функционировании и модулировании медиаторного, гормонального, рецепторного ответов, иммунологических, воспалительных, антибактериальных и противовирусных реакций, обладая антиканцерогенным действием [A.B. Sharma, 2008; F. Campos et al., 2012; P. Proia et al., 2016; N. Moro et al., 2016; R.T. Mallet, 2018; M. Zhang et al., 2018].

Вышеописанные способности изучаемых малых молекул, позволили нам предположить возможность их влияния на один из ключевых механизмов организма – белок-белковое взаимодействие. Взаимодействие антигенов с антителами является одной из разновидностей белок-белкового взаимодействия, а антигены группы крови системы АВ0 человека, презентированные на мембране эритроцита, являются распространенными и доступными для анализа, а также количественной оценки. Далее мы провели серию экспериментов *in vitro* с использованием преинкубации с растворами пирувата и лактата белковых молекул гликопротеинов А и В и естественных иммуноглобулинов системы АВ0.

Углеводные компоненты антигенов А и В по-разному отвечают на влияние пируватом и лактатом (таблица 1).

При добавлении лактата отмечается замедление скорости образования белок-белковых комплексов детерминанты А, время агглютинации гликопротеина А А(II) удлинилось на 40% ($p<0,001$), гликопротеина А АВ(IV) - увеличилось на 51,6% ($p<0,0001$). Пируват в меньшей степени замедлял образование комплексов: время агглютинации гликопротеина А А(II) изменилось на 16% ($p<0,001$), гликопротеина А АВ(IV) на 23% ($p<0,0001$) в отличие от контрольных значений. При добавлении пирувата отмечается удлинение времени наступления агглютинации гликопротеина В АВ(IV) на 23% ($p<0,0001$), время образования комплексов гликопротеина В В(III) ($p<0,05$) незначительно увеличилось по сравнению с контрольным значением. Время агглютинации гликопротеина В В(III) при инкубации с лактатом изменилось на

18% ($p<0,05$) от контрольных значений, гликопротеина В АВ(IV) удлинилось на 35% ($p<0,01$).

Таблица 1 – Время взаимодействия группоспецифичных белков с агглютинидами при внесении малых молекул, сек.

n=20	Пируват	Лактат
	Mean ± m	Mean ± m
Гликопротеин А		
Контроль гликопротеин А группы крови А(II)	5,95±0,01	5,95±0,01
Гликопротеин А группы крови А(II)	7,0±0,25*	8,4±0,16*
Контроль гликопротеин А группы крови АВ(IV)	5,95±0,01	5,95±0,01
Гликопротеин А группы крови АВ(IV)	7,4±0,16 [#]	9,1±0,27 [#]
Межгрупповая значимость	А(II) Л - А(II) П p=0,0002 А(IV) Л - А(IV) П p<0,0001	
Гликопротеин В		
Контроль гликопротеин В группы крови В(III)	5,95±0,1	5,95±0,1
Гликопротеин В группы крови В(III)	6,4±0,16**	7,1±0,27**
Контроль гликопротеин В группы крови В(IV)	5,95±0,1	5,95±0,1
Гликопротеин В группы крови АВ(IV)	7,4±0,15 [#]	8,1±0,45 ^{##}
Межгрупповая значимость	В(III) Л- В(III) П p=0,04 В(IV) Л - В(IV) П p=0,009	

Примечание: [#] $p<0,0001$ * $p<0,001$
^{##} $p<0,01$ ** $p<0,05$

При сравнительной оценке степени взаимодействия белковых структур с пируватом и лактатом отмечается максимальное значение в эксперименте с гликопротеинами А А(II) и гликопротеинами В В(III), как и в контроле – 12 pt. Гликопротеины А и В эритроцитов АВ(IV) группы с меньшей степенью выраженности вступают в белок-белковые взаимодействия как после инкубации с лактатом, так и пируватом. Обращает на себя внимание, что лактат проявляет себя с большей биологической активностью, в отличие от пирувата, удлиняя время вступления во взаимодействие белковых структур с большей степенью с углеводными компонентами N-ацетилгалактозамина А(II) и АВ(IV) групп.

Естественные антитела представляют собой иммуноглобулины класса М, и по-разному отвечают на воздействие интермедиатами. Отмечается, что степень агглютинации анти-В антитела после внесения пирувата увеличилась на 25% ($p<0,05$), а анти-А антитело стабильно. При внесении в экспериментальную среду лактата выявлено снижение интенсивности взаимодействия естественных антител со стандартными эритроцитами: анти-А антитело ($p<0,05$) на 40%, анти-В антитело ($p<0,05$) на 55%.

Следующим этапом была визуализация белковых комплексов, и количественная оценка в условиях действия лактата и пирувата с применением конфокальной микроскопии. В режиме основного рассеивания (таблица 2) были

выявлены сонаправленные и стимулирующие эффекты лактата и пирувата на гликопротеин А, однако различные по силе вызываемого ответа: внесение лактата приводит к образованию большего количества комплексов в сравнении с пируватом ($p=0,02$), которые занимают большую среднюю площадь ($p=0,003$). Влияние малых молекул на гликопротеин В вызвало ингибирующее и сонаправленное влияние на количество образованных комплексов ($p=0,0001$) в сравнении с контролем при внесении лактата ($p<0,0001$) и пирувата ($p<0,0001$).

Таблица 2 – Влияние лактата и пирувата на гликопротеины А и В в режиме основного рассеивания

	Контроль А(II) $M \pm m$	А(II)+Л $M \pm m$	А(II)+П $M \pm m$	Контроль В(III) $M \pm m$	В (III)+Л $M \pm m$	В (III)+П $M \pm m$
Количество комплексов	16,25±0,48	48,7±7,3	20,5± 5,9	55,5 ± 1,7	17 ± 0,6	32,7±1,0 3
p		0,004	0,5		< 0,0001	<0,0001
Средняя площадь 1 комплекса, $мкм^2$	499,2 ± 64	759,65 ± 128,7	518,6 ± 149,2	697,4 ± 39,5	390 ± 87	302,5 ± 25,27
p		0,04	0,5		0,001	<0,0001
Средняя площадь 1 комплекса в кадре, %	0,31 ± 0,04	0,48 ± 0,08	0,32 ± 0,09	0,44 ± 0,025	0,24 ± 0,054	0,19 ± 0,016
p		0,04	0,5		0,001	<0,0001
Средняя сумма площадей всех комплексов в кадре, %	5,04 ± 0,62	23,4 ± 1,95	6,56 ± 3	24,42 ± 2,17	4,08 ± 0,64	6,2 ± 0,87
p		0,0001	0,63		0,0006	0,0003

Для повышения точности интерпретации мы провели анализ данных в режиме флуоресценции, при котором эмиссия регистрируется только от комплексов антигена и соответствующего ему моноклонального антитела с флуоресцентной меткой, исключая ряд неспецифических взаимодействий (таблица 3).

Полученные результаты анализа микрофотографий в режиме флуоресценции показали сохранение тенденции, которые были выявлены в режиме основного рассеивания. Внесение лактата и пирувата в экспериментальную систему с гликопротеином А приводит к увеличению средней интенсивности зеленого пикселя в кадре, при этом эффект лактата выражен сильнее, чем пирувата ($p=0,01$). Инкубация антигена В с исследуемыми метаболитами ($p<0,0001$) приводит к снижению средней интенсивности зеленого пикселя в сравнении с

контролем при этом эффект лактата и пирувата соизмерим по выраженности и не отличим друг от друга.

Таблица 3 – Влияние лактата и пирувата на гликопротеины А и В в режиме флуоресценции

	Контроль А(II)	А(II)+Л	А(II)+П	Контроль В(III)	В(III)+Л	В(III)+ П
Средняя интенсивность пикселя green, y.e. $M \pm m$	$6,2 \pm 0,98$	$13,4 \pm 1,97$	$6,8 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,05$	$0,2 \pm 0,04$	$0,28 \pm 0,073$
95% ДИ	3,45 - 8,90	7,09-19,6	6,41-7,11	2,51-2,85	0,05-0,32	0,05-0,52
p		0,01	0,62		<0,0001	<0,0001
	p Л-П= 0,01			p Л-П= 0,3		

Антиген-антительное взаимодействие, которое является разновидностью белок-белковых взаимодействий, является недостаточно изолированной системой из-за наличия ряда факторов, составляющих микроокружение эритроцит, в том числе многочисленных протеинов, рецепторов, которые неспецифически могут вступать в реакции с естественными интермедиатами. Для дальнейшего изучения влияния естественных интермедиатов нами были выбраны изолированные системы, монокаталитические белки, обладающие свойствами и функциями, поддающимися количественной оценке.

Установление факта взаимодействия малой молекулы с белком стало более доступно с применением методов флуоресценции (эндогенной, и с использованием флюорофоров), сканирующей флуориметрии, микротермофореза [L. Jin, W. Wang, G. Fang, 2014]. Нами были проведены эксперименты для определения степени сродства белка с малой молекулой, для оценки использовали стехиометрический параметр – константу диссоциации, численно равный концентрации лиганда, при которой содержание свободной и связанной молекулы-партнера равны. В качестве белковых молекул в эксперименте использовали монокаталитические белки глицерофосфатдегидрогеназу и лактатдегидрогеназу, лигандами выступали растворы малых молекул – лактат, пируват, оксалоацетат, малат.

С использованием метода капиллярного термофореза нами были вычислены константы диссоциации для глицерофосфатдегидрогеназы с оксалоацетатом составила 3,17 мкМ, пируватом 6,59 мкМ, малатом 3,89 мкМ, лактатом 1,0 мкМ. Обращает на себя внимание различное сродство метаболитов к молекуле фермента, однако представленные значения константы диссоциации свидетельствуют о достаточно сильном сродстве лактата к молекуле

глицерофосфатдегидрогеназы и более слабом аффинитете связи к другим малым молекулам – пирувату, оксалоацетату, малату.

Константы диссоциации изучаемых метаболитов с молекулой лактатдегидрогеназы составили: с пируватом 0,03 мкМ, лактатом 0,22 мкМ, оксалоацетатом 0,46 мкМ, малатом 1,81 мкМ. Окислительно-восстановительная пара лактат-пируват, которые являются субстратами для лактатдегидрогеназы проявили максимально высокое сродство к молекуле белка, по сравнению с парой оксалоацетат-малат.

Нами был проведен эксперимент по оценке процесса формирования пространственной структуры глицерофосфатдегидрогеназы под влиянием пирувата, лактата, оксалоацетата и пирувата с использованием метода дифференциальной сканирующей флуориметрии, с использованием внутренней флуоресценции триптофана или тирозина при длинах волны 330 и 350 нм. Термостабильность молекулы изменяется под влиянием малых молекул в концентрациях 0,5 мкМ – 16 мкМ, что отображается в изменении глубины образованных пиков на кривой первой производной (рисунок 4).

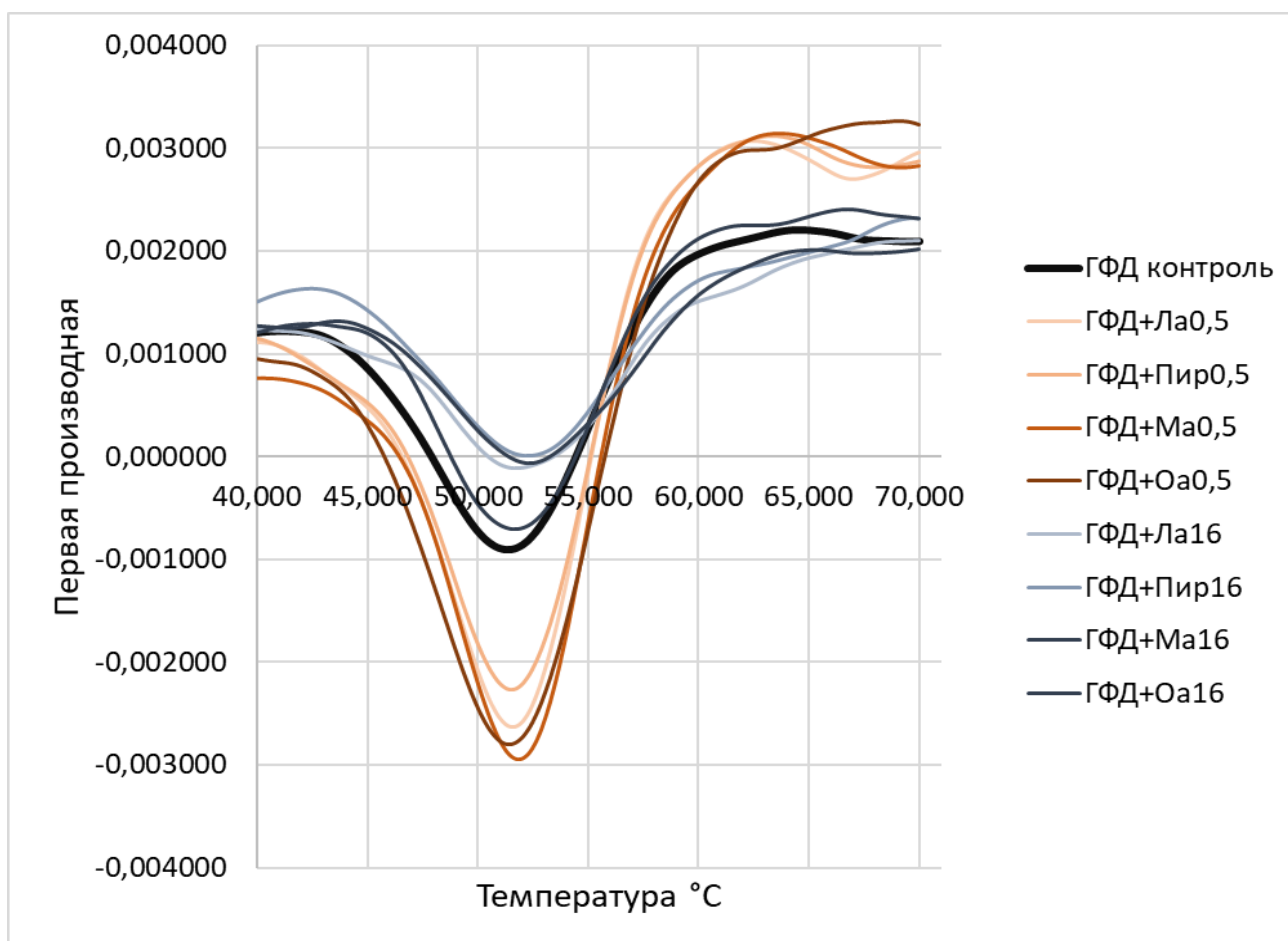


Рисунок 4 – Влияние оксалоацетата, пирувата, малата и лактата в конечной концентрации 0,5 мкМ и 16 мкМ на глицерофосфатдегидрогеназу

Отмечается максимальное влияние раствора пирувата в конечной концентрации 16 мкМ на конформацию каталитического белка, в комплексе с оксалоацетатом в этой же концентрации кривая плавления близка к контрольным значениям. При уменьшении концентрации метаболитов до 0,5 мкМ специфичность влияния на фермент исследуемых веществ остается сонаправленной, стабилизируя белковую молекулу, у пирувата эффекты менее выражены по сравнению с остальными метаболитами, у малата – максимальные проявления, что свидетельствует о различном конформационном состоянии исследуемых комплексов белок-лиганд.

Интересным является тот факт, что данная тенденция сохраняется как для глицерофосфатдегидрогеназы, так и для лактатдегидрогеназы и со всеми концентрациями лигандов и носит дозозависимый характер. В таблице 4 представлена температура начала плавления и точка температурного перегиба лактатдегидрогеназы при постоянной концентрации 1 мкМ после инкубации с естественными интермедиатами (оксалоацетат, пируват, малат, лактат) в изменяющейся конечной концентрации (от 16 до 0,5 мкМ). Контрольные значения температуры начала плавления лактатдегидрогеназы составила 50,5°C, точки температурного перегиба 56,3°C.

Таблица 4 – Температура начала плавления и точки температурного перегиба лактатдегидрогеназы при добавлении естественных интермедиатов

Концентрация лиганда, мкМ	ЛДГ+Лактат		ЛДГ+Пируват	
	t начала плавления, °C	t перегиба, °C	t начала плавления, °C	t перегиба, °C
16	45,8°C	55,9°C	47,0°C	56,2°C
8	50,9°C	56,4°C	50,6°C	56,4°C
4	51,6°C	56,5°C	51,0°C	56,6°C
2	50,9°C	56,7°C	51,6°C	56,6°C
1	51,1°C	56,7°C	51,3°C	56,7°C
0,5	51,1°C	56,7°C	51,3°C	56,7°C
Концентрация лиганда, мкМ	ЛДГ+Малат		ЛДГ+Оксалоацетат	
	t начала плавления, °C	t перегиба, °C	t начала плавления, °C	t перегиба, °C
16	47,4°C	56,0°C	48,3°C	56,0°C
8	51,0°C	56,5°C	51,1°C	56,4°C
4	51,5°C	56,8°C	51,7°C	56,5°C
2	51,3°C	56,7°C	51,5°C	56,6°C
1	51,1°C	56,6°C	50,8°C	56,6°C
0,5	50,8°C	56,7°C	51,1°C	56,6°C

Контроль ЛДГ: Т начала плавления = 50,5°C, Т перегиба = 56,3°C

Цветом отмечена шкала температурного градиента, области низких и высоких значений.

Высокое содержание малых молекул (16 мкМ) способствует разворачиванию молекулы белка, что выражается в снижении его термостабильности: снижение температуры начала плавления (оксалоацетат - 48,3°C, пируват - 47°C, лактат – 45,8°C, малат – 47,4°C в сравнении с 50,5°C для контрольной пробы), более быстрое наступление точки температурного перегиба (оксалоацетат - 56,0°C, пируват -56,2°C, лактат – 55,9°C, малат – 56,0°C в сравнении с 56,3°C в контрольной пробе). Напротив, добавление изучаемых биологически активных соединений в минимальной концентрации (0,5 мкМ) приводит к свернутой конформации белка, что приводит к повышению термостабильности лактатдегидрогеназы: температура начала плавления белка увеличилась в сравнении с контролем и составила для лактата и оксалоацетата - 51,1°C, пирувата – 51,3°C и малата – 50,8°C. Произошел сдвиг наступления температурного перегиба - 56,6°C для оксалоацетата, 56,7°C – для лактата, пирувата и малата.

Изучаемые биологически активные соединения в концентрации 0,5 - 1 мкМ вызывают повышение температуры плавления белков, проявляя протективное действие и формируют наиболее выгодное каталитически активное – свернутое – состояние. Оксалоацетат, пируват, малат и лактат в концентрации 16 мкМ снижают термостабильность фермента, разворачивая конформационную структуру ферментов.

Нами было проанализировано влияние различных концентраций исследуемых метаболитов на соотношение флуоресценций лактатдегидрогеназы (350/330 нм) в физиологическом диапазоне температур 36,5-37,5 °C. Проводили сравнение пар лигандов пируват-оксалоацетат и лактат-малат (рисунок 5).

Интересными являются данные, что растворы пирувата ($p < 0,001$) и оксалоацетата ($p < 0,001$) в конечной концентрации 0,5-4 мкМ вызывают снижение соотношения флуоресценции по сравнению с контролем. При этом наиболее выраженный эффект оказывают изучаемые малые молекулы в конечной концентрации 0,5 мкМ. Для обоих лигандов в концентрации 16 мкМ соотношения флуоресценции существенно выше контроля. При всех изученных концентрациях естественных метаболитов более высокие значения соотношения флуоресценции выявлены для пирувата, чем для оксалацетата ($p < 0,001$). Для пары метаболитов лактат-малат получены аналогичные результаты: существенное снижение соотношений флуоресценций вызывают минимальные концентрации лактата или малата — 0,5 мкМ ($p < 0,001$) по сравнению с контролем.

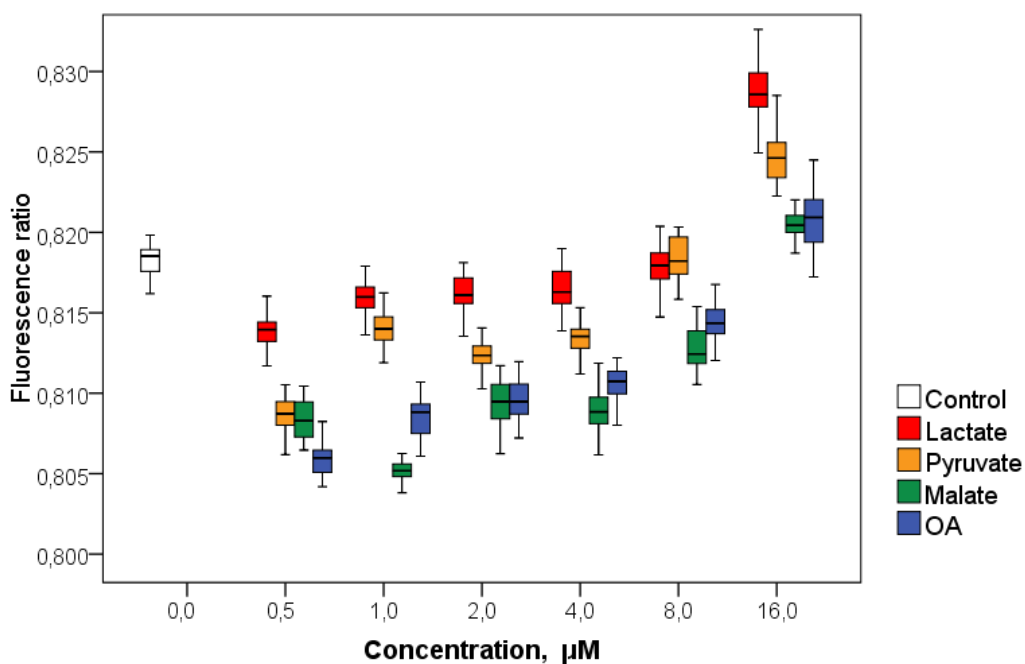


Рисунок 5 – Влияние пирувата, оксалоацетата, лактата и малата на лактатдегидрогеназу в физиологическом диапазоне температур

По мере роста концентрации лиганда различия с контролем уменьшаются. Однако, при дальнейшем росте концентрации биологически активных соединений до 16 мкМ отмечено более высокое значение соотношения флуоресценции как для лактата, так и для малата по сравнению с контролем.

Следующим этапом нашего исследования стало изучение влияния естественных метаболитов на каталитическую функцию глицерофосфатдегидрогеназной, лактатдегидрогеназной систем, а также систему ферментов малатдегидрогеназа – лактатдегидрогеназа.

Данные по изучению влияния пирувата, лактата, оксалоацетата, малата в диапазоне концентраций 1 мкМ – 1 мМ на функционирование глицерофосфатдегидрогеназной системы показали разнонаправленное действие изучаемых малых молекул, дозозависимого эффекта не было выявлено. Так, малат с высокой степенью достоверности в различных концентрациях в целом снижает активность фермент-субстратной системы. При введении лактата, отмечается, что 0,1 мМ, 10 мкМ и 1 мкМ концентрации лиганда снижают активность фермента, при добавлении пирувата наблюдается обратное действие: конечные концентрации 1 мМ, 0,1 мМ, 1 мкМ повышают активность фермента. Интересным является наблюдение, что биологически активные соединения в конечной концентрации 1 мкМ по-разному влияют на функционирование фермент-субстратной системы: гидроксикислоты малат ($p=0,0005$) и лактат ($p=0,0008$) обладают ингибирующим действием на глицерофосфатдегидрогеназу, а кетокислоты оксалоацетат – пируват, наоборот увеличивают активность фермента, действуя активирующе (рисунок 6). При

межгрупповом сравнении действия окислительно-восстановительных партнеров оксалоацетат – малат в конечных концентрациях 1 мМ ($p=0,0015$) и 1 мкМ ($p=0,0009$) достоверно значимы.

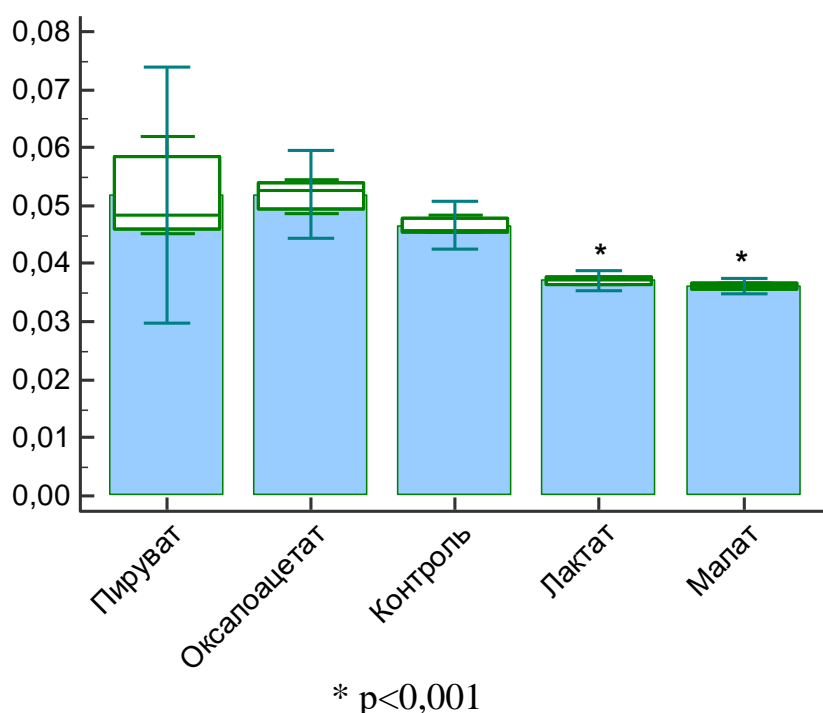


Рисунок 6 – Влияние малых молекул в конечной концентрации 1 мкМ на активность глицерофосфатдегидрогеназы

Далее мы изучили влияние оксалоацетата и малата в диапазоне концентраций 1 мкМ – 5 мМ на работу лактатдегидрогеназной системы. Низкие концентрации естественных интермедиатов 1 мкМ и 10 мкМ увеличивают активность фермента, межгрупповое сравнение окислительно-восстановительных партнеров в прямой реакции в концентрации 1 мкМ ($p < 0,0001$) статистически значимо. Эффекты малата и оксалоацетата в миллимолярной конечной концентрации сонаправлены, обладают ингибирующим и дозозависимым действием на активность лактатдегидрогеназы. В конечной концентрации 5 мМ, изучаемые интермедиаты полностью ингибируют фермент-субстратное взаимодействие и активность каталитического белка не определяется.

Межгрупповое сравнение пары метаболитов оксалоацетат – малат показало, что их действие по интенсивности достоверно различимы. Малат в концентрациях 0,1 мМ ($p=0,0013$), 1 мМ ($p < 0,0001$), 1,5 мМ ($p < 0,0001$), 2 мМ ($p < 0,0001$) интенсивнее снижает активность лактатдегидрогеназной системы, обладая ингибирующим действием (рисунок 7). Методами компьютерного моделирования был определен полный спектр биологической активности пирувата, лактата, малата, оксалоацетата, и спрогнозированы партнеры взаимодействия. Мы изучили влияние биологически активных соединений на

функционирование изолированных от микроокружения каталитических белков и фермент-субстратных систем *in vitro*.

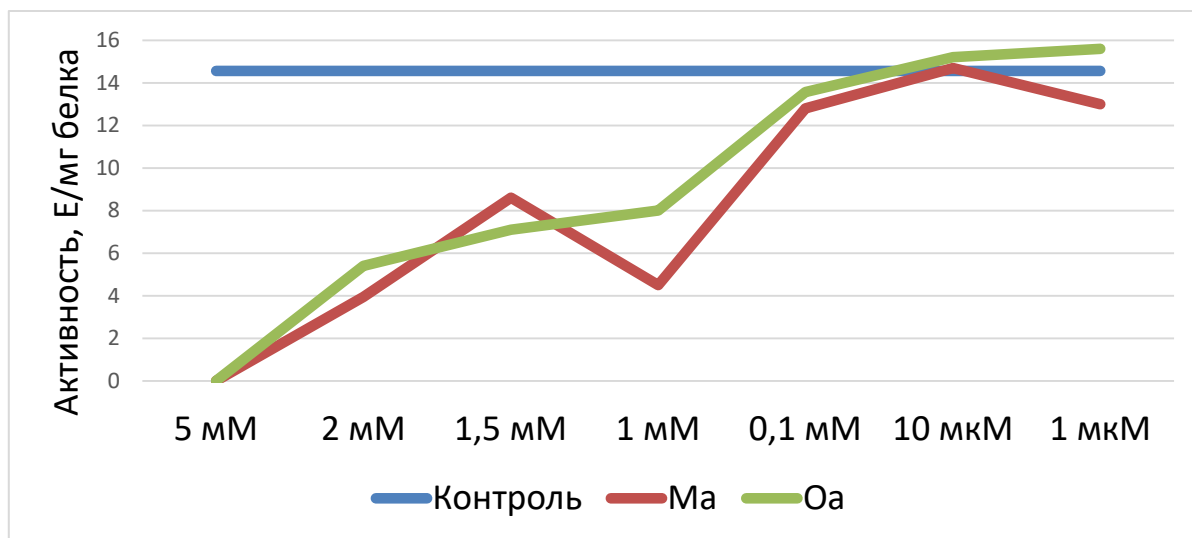


Рисунок 7 – Влияние оксалоацетата и малата на активность лактатдегидрогеназы

Тем не менее, *in vivo* различные возможные взаимодействия естественных метаболитов с внутри- и внеклеточными структурами мало изучены. Следующим этапом нашей работы является выяснение роли малых молекул в определении жизнеспособности клеточной культуры дермальных фибробластов человека.

Мы рассматриваем метаболиты как фенотипический ответ биологических систем на происходящие в их микроокружении изменения. Согласно L. Willmann (2015) метаболиты культуры клеток состоят из внутриклеточных метаболитов (эндометаболизма) и метаболитов, выделяемых во внеклеточную среду (экзометаболизма). При изучении клеточных культур необходимо учитывать общий метаболический статус, относительную интенсивность различных метаболических процессов, а также изменения, вызванные исследуемыми факторами. Для оценки влияния пирувата, лактата, оксалоацетата, малата в конечной концентрации 1,5 мМ мы оценивали метаболический профиль эндометаболизма - лизат клеточной культуры фибробластов, особенности протекания метаболических процессов, функционирование фермент-субстратных систем внеклеточной среды оценивались в надосадочной жидкости, в которой росли клетки.

При сравнении содержания метаболитов в полной питательной среде без клеток и среде культивирования фибробластов без внесения малых молекул было выявлено достоверное изменение содержания глюкозы ($p < 0,0001$), лактата ($p < 0,0001$) и пирувата ($p < 0,0001$), при этом снижение уровня глюкозы сопровождалось накоплением лактата и увеличением содержания пирувата, что

отражает реализацию базовых метаболических потребностей фибробластов преимущественно за счет анаэробных процессов (таблица 5).

Таблица 5 – Метаболический профиль надосадочной жидкости фибробластов после культивирования с малыми молекулами

	Контроль среда	Контроль с ФБ	Пируват	Малат	Лактат	Оксалоаце тат
	M ± m					
Холестерин, ммоль/л	0,098± 0,002	0,11 ± 0,0067	0,075 ± 0,0056	0,08± 0,004	0,09± 0,006	0,08±0,006
95% ДИ	0,09-0,10	0,09- 0,13	0,06 -0,09	0,07 -0,09	0,08 -0,11	0,055 - 0,1
р контроль среда		0,226				
р контроль с ФБ			0,003	0,004	0,116	0,033
рANOVA			р П-Л <0,0001			
Глюкоза, ммоль/л	6,0 ± 0,09	4,3 ± 0,1	3,4 ± 0,09	3,64±0,14	5,4± 0,13	3,9± 0,18
95% ДИ	5,8 - 6,2	4,05 - 4,5	3,02- 3,64	3,31- 3,97	5,00- 5,82	3,4 - 4,4
р контроль среда		< 0,0001				
р контроль с ФБ			< 0,0001	0,0017	< 0,0001	0,0686
рANOVA			р П-Л 0,0046		р М-Л <0,0001	
Пируват, ммоль/л	0,0039 ± 0,00013	0,118± 0,0001	0,9 ± 0,004	0,175± 0,0038	0,031± 0,00038	0,62± 0,0024
95% ДИ	0,0034 – 0,0045	0,118- 0,119	0,89 - 0,92	0,13 - 0,22	0,03- 0,033	0,61-0,624
р контроль среда		< 0,0001				
р контроль с ФБ			< 0,0001	0,0003	< 0,0001	< 0,0001
рANOVA			р П-Л 0,0111 р П-М 0,0029		р О-Л 0,369	
Лактат, ммоль/л	2,58 ± 0,1	6,8 ± 0,4	6,58±0,16	6,78±0,42	25,4±1,23	6,63±0,18
95% ДИ	2,35 -2,82	5,83 -7,78	6,2 - 6,98	5,84 -7,90	21,4-29,2	5,87 - 7,40
р контроль среда		< 0,0001				
р контроль с ФБ			0,6445	0,9087	< 0,0001	0,8137
рANOVA			р П-Л 0,0179 р О-Л 0,0208		р М-Л 0,0219	
Глюкоза/лактат	2,38±0,04	0,57±0,06	0,49±0,007	0,6±0,007	0,2±0,005	0,55±0,005
95% ДИ	2,24 -2,52	0,37 -0,77	0,46 - 0,52	0,57 -0,63	0,19-0,23	0,52 – 0,57
р контроль среда		< 0,0001				
р контроль с ФБ			0,3333	0,6985	0,0014	0,7652
рANOVA			р П-Л 0,0063 р П-М 0,0414		р М-Л 0,0059 р О-Л 0,0001	
Глюкоза/пируват	1480,12 ± 34,25	34,26 ± 1,04	3,56 ± 0,16	20,76 ± 0,53	177,82 ± 2,8	5,87 ± 0,12
95% ДИ	1332,74 - 1627,5	29,77 - 38,75	2,87 - 4,24	14,08 - 27,44	165,63 - 190,00	5,34 - 6,39
р контроль среда		< 0,0001				
р контроль с ФБ			< 0,0001	0,0024	< 0,0001	< 0,0001
рANOVA			р П-М 0,05			

Дальнейшее сравнение проводилось относительно культуральной среды фибробластов без внесения малых молекул и отдельных образцов культуры клеток с добавлением малых молекул (пируват, лактат, малат, оксалоацетат). Отмечается, что внесение малых молекул в инкубационную среду с фибробластами приводит к изменению содержания метаболитов в надосадочной жидкости. Наблюдается достоверное снижение холестерина при инкубации с малыми молекулами: при этом наиболее выраженные изменения регистрируются при внесении пирувата ($p=0,003$), а наименее – при внесении лактата, отличие в действии пары метаболитов пируват – лактат ($p<0,0001$) является статистически значимым.

При оценке изменения содержания глюкозы под воздействием малых молекул были выявлены следующие особенности: внесение пирувата приводило к снижению содержания глюкозы на 21% ($p<0,0001$), малата на 15% ($p<0,0001$), влияние оксалоацетата на уровень глюкозы оказалось не значимым. Добавление лактата ($p<0,0001$), напротив, приводило к увеличению уровня глюкозы на 25% по сравнению с контролем. При этом эффект лактата отличается по направленности и выраженности как от своего редокс-партнера (p лактат-пируват= $0,0046$), так и от гидрокси-аналога (p лактат-малат $<0,0001$). Выявленные изменения, вероятно, указывают на разнонаправленную и избирательную утилизацию метаболитов: уменьшение уровня глюкозы при внесении пирувата может указывать на то, что пируват является приоритетным донором углеродного скелета при построении аминокислот и для других пластических целей, в то время как повышение глюкозы при внесении лактата указывает на потенциальную активизацию глюконеогенетической конверсии данной молекулы в глюкозу *de novo*.

Добавление пирувата, малата и оксалоацетата в среду с растущими фибробластами не приводит к статистически значимому изменению уровня лактата, содержание данного метаболита снижается, но остается близким к контрольным значениям, что позволяет рассуждать об относительно постоянном уровне лактата как о необходимом условии для нормального функционирования физиологических систем. При внесении лактата отмечался рост содержания данного метаболита, что, вероятно, имеет искусственное происхождение и не подлежит содержательной интерпретации. При оценке индекса глюкоза/лактат были выявлены следующие особенности: наиболее высокий индекс характерен для малата $0,6 \pm 0,007$, а самый низкий – для лактата $0,2 \pm 0,0052$ ($p=0,0014$). Обращает на себя внимание достоверное отличие полученного соотношения в парах между всеми метаболитами, что указывает на индивидуальные паттерны утилизации энергетических субстратов при культивировании фибробластов с различными малыми молекулами.

Анализ уровня пирувата показал, что при росте клеток с раствором оксалоацетата ($p < 0,0001$) наблюдается увеличение содержания пирувата в 5,2 раза по сравнению с контрольными значениями, что может быть объяснено легкостью конверсии оксалоацетата в пируват, поскольку данные соединения обладают структурным сходством, являются кето-кислотами и отличаются друг от друга одной карбоксильной группой. Добавление лактата в среду для роста фибробластов снижает уровень пирувата на 74% ($p < 0,0001$), вероятно, благодаря усиленной его утилизации в цикле Кребса. Сравнение окислительно-восстановительных партнеров пирувата и лактата ($p = 0,01$) показывает достоверно значимое разнонаправленное действие этих биологически активных соединений при добавлении к культуре фибробластов. При межгрупповом сравнении пар метаболитов пируват – малат ($p = 0,0029$), отмечается достоверно значимое увеличение пирувата, возможно, по принципу обратной связи в надосадочной жидкости фибробластов в двух образцах. Изучение индекса глюкоза/пируват выявило его значимое снижение в сравнении с контролем для всех метаболитов, кроме пирувата, вместе с тем, при сравнении полученного эффекта между парами метаболитов не было выявлено достоверных отличий за исключением пары малат-пируват.

При анализе показателей эндометаболизма отмечается, что культивирование фибробластов с малыми молекулами способствует понижению внутриклеточного содержания глюкозы. Наибольшее снижение на 60% уровня глюкозы внутри клетки отмечается при росте клеток с раствором лактата ($p = 0,04$).

При оценке уровня пирувата, обращает на себя внимание разнонаправленное влияние изучаемых интермедиатов на его внутриклеточное содержание. Добавление раствора пирувата ($p < 0,0001$) увеличивает уровень этого метаболита в лизате фибробластов в 7,8 раз, при росте клеток с раствором оксалоацетата ($p < 0,0001$) наблюдается также увеличенное производство фибробластами пирувата на 24%, что объясняется структурным сходством этих двух биологически активных соединений, оксалоацетат отличается от пирувата наличием дополнительной карбоксильной группы. У фибробластов, растущих в среде с лактатом ($p < 0,0001$) и малатом ($p < 0,0001$) наблюдается снижение уровня пирувата в супернатанте на 37% и 96% соответственно. Сравнение в группе кетокислот пирувата и оксалоацетата ($p = 0,0071$) выявлено увеличение внутриклеточного содержания пирувата, гидроксикислот малат-лактат ($p < 0,0001$), отмечается снижение этого показателя.

При анализе показателей лактата внутри клетки отмечается его снижение в лизате клеток, растущих в питательных средах с добавлением пирувата на 15%, а малата и оксалоацетата на 38,5%. Анализ коэффициентов глюкоза/лактат показал, что для лактата характерен самый низкий индекс $0,29 \pm 0,087$ ($p = 0,05$),

который сопоставим с этим показателем в надосадочной жидкости. Изучение коэффициента глюкоза/пируват выявило его достоверно значимое снижение для всех изучаемых малых молекул, и выявлены достоверные отличия при межгрупповом сравнении для всех пар метаболитов.

В таблице 6 показано изменение активности ряда ферментов фибробластов под влиянием малых молекул. В сравнении с бесклеточной средой, добавление культуры фибробластов приводит к значимому увеличению активности глицерофосфатдегидрогеназы ($p=0,047$) и щелочной фосфатазы ($p=0,0002$), активность гамма-глутамилтранспептидазы, напротив, имеет тенденцию к снижению, однако изменение относительно бесклеточного контроля незначимо.

Таблица 6 – Активность ферментов в надосадочной жидкости фибробластов после культивирования с малыми молекулами

	Контроль среда $M \pm m$	Контроль с ФБ $M \pm m$	Пируват $M \pm m$	Малат $M \pm m$	Лактат $M \pm m$
ГФД, Е/мл	$0,022 \pm 0,0009$	$0,064 \pm 0,015$	$1,4 \pm 0,11$	$0,057 \pm 0,019$	$0,013 \pm 0,0015$
95% ДИ	0,018 - 0,025	0,0006 - 0,13	0,9 - 1,8	0,025 – 0,14	0,0065 - 0,019
р контроль среда		0,0479			
р контроль с ФБ			0,0003	0,7867	0,0276
р ANOVA			р П-Л 0,0192	р П-М 0,0276	
ЩФ, Е/л	$24,15 \pm 0,22$	$33,95 \pm 1,19$	$26,97 \pm 1,13$	$28,97 \pm 0,88$	$34,2 \pm 0,88$
95% ДИ	23,46 - 24,84	30,16 - 37,74	22,1 - 31,85	25,16 - 32,77	31,4 – 37,0
р контроль среда		0,0002			
р контроль с ФБ			0,0092	0,0259	0,8712
р ANOVA			р Л-П 0,0001	р Л-М 0,0051	
ГГТП, Е/л	$0,5 \pm 0,045$	$0,3 \pm 0,153$	$0,25 \pm ,096$	$0,15 \pm 0,03$	$1,03 \pm 0,033$
95% ДИ	0,38 - 0,62	0,044 – 0,64	0,055 – ,55	0,06 - 0,24	0,89 – 1,18
р контроль среда		0,1053			
р контроль с ФБ			0,7409	0,2283	0,0025
р ANOVA			р Л-П 0,0306	р Л-М 0,0123	

Внесение биологически активных соединений, в частности, пирувата ($p=0,0003$), приводит к выраженному увеличению активности глицерофосфатдегидрогеназы в сравнении с контролем, при этом эффект в паре пируват-лактат статистически различим ($p=0,0192$). Противоположное воздействие отмечается в случае щелочной фосфатазы: пируват ($p=0,0092$) и

малат ($p=0,0259$) снижают активность данного фермента, в то время как лактат не оказывает влияния. Схожий по направленности эффект наблюдается с активностью гамма-глутамилтранспептидазы как и в случае с щелочной фосфатазой, пируват и малат снижают активность данного фермента, однако добавление лактата приводит к значимому увеличению активности фермента ($p=0,02$). Такой прирост активности ГГТП может быть объяснен с позиции прооксидантного эффекта лактата, синтезирующегося при росте фибробласта. ГГТП в норме присущи противорадикальные эффекты, но в условиях, создающихся при увеличении концентрации лактата, фермент также может оказывать прооксидантное действие и усиливать каскад свободнорадикальных реакций, запуская патологические для клетки процессы.

Добавление малых молекул в культуральную среду фибробластов приводит к значимому снижению активности гамма-глутамилтранспептидазы в лизате клеток, по сравнению с контролем, что совпадает с полученными данными во внеклеточной жидкости.

Культивирование фибробластов с раствором лактата ($p=0,0001$) достоверно увеличивает внутриклеточную активность щелочной фосфатазы более чем в 2 раза, однако вне клетки активность фермента достоверно не изменялась. При межгрупповом сравнении пар метаболитов лактат-пируват ($p=0,03$) отмечается значимое влияние лактата на активность щелочной фосфатазы. При межгрупповом сравнении пары оксалоацетат-малат ($p<0,0001$) отмечается более выраженный ингибирующий эффект оксалоацетата, что, вероятно, свидетельствует о протективном действии и участии в структурообразовании клеточных компонентов фибробластов.

Наблюдается обратный по направленности эффект малых молекул на активность глицерофосфатдегидрогеназы внутри клеток по сравнению со значениями в надосадочной жидкости. Добавление растворов малата ($p<0,0001$) и пирувата ($p<0,0001$) обладает выраженным ингибирующим влиянием на активность глицерофосфатдегидрогеназы. Растворы лактата ($p<0,0001$) и оксалоацетата ($p<0,0001$), в свою очередь обладая противоположным действием, увеличивают активность глицерофосфатдегидрогеназы в клеточном лизате. При межгрупповом сравнении окислительно-восстановительных пар метаболитов пируват-лактат ($p<0,0001$) и оксалоацетат-малат ($p<0,0001$) эффект статистически различим.

Описанные молекулярные изменения процессов жизнедеятельности фибробластов находят свое подтверждение в тестах, характеризующих жизнеспособность клеток (таблица 7). Определение влияния изучаемых молекул на жизнеспособность клеток дополнительно проводили при помощи лактатдегидрогеназного теста. Выявлено, что различия показателей ЛДГ-теста между контролем и экспериментальными образцами не значимы, что

свидетельствует об отсутствии цитотоксичности или протективного действия оксалоацетата и малата в данном тесте. Полученные для пирувата и лактата данные представляют собой артефакт, поскольку эти соединения являются субстратами реакции, катализируемой ЛДГ.

Таблица 7 – МТТ тест после инкубации фибробластов с малыми молекулами

	М ± m	95% ДИ	p контроль	% жизнеспособных клеток
Контроль	0,55 ± 0,03	0,45 - 0,66		
Лактат	0,18 ± 0,05	0,017 - 0,34	0,005	32,3%
Малат	0,71 ± 0,07	0,46 - 0,88	0,019	127,3%
Оксалоацетат	0,74 ± 0,09	0,49 - 0,99	0,028	133,8%
Пируват	0,52 ± 0,06	0,34 - 0,71	0,55	95,0%

В соответствии с представленными результатами, лактат снижает жизнеспособность клеток на 67,6% ($p=0,005$), пируват не оказывает достоверного влияния, сохраняя жизнеспособность клеток на уровне контроля, малат и оксалоацетат увеличивают жизнеспособность фибробластов на 27,3% ($p=0,019$) и 33,8% ($p=0,028$) соответственно.

Показано стимулирующее действие оксалоацетата ($p=0,028$) и малата ($p=0,019$) на первичную культуру дермальных фибробластов человека, что выражалось в увеличении параметров жизнеспособности клеток. Метаболический профиль при добавлении оксалоацетата и малата является сопоставимым, внесение этих молекул приводит к сонаправленному изменению показателей жизнедеятельности фибробластов, при этом наблюдается различие в содержании пирувата и индексе глюкоза/пируват, которое регистрируется при добавлении оксалоацетата, что, вероятно, объясняется структурным переходом одного метаболита в другой ввиду близкой химической организации или особенностями регуляции активности ферментов цикла трикарбоновых кислот в условиях избытка интермедиатов. Внесение лактата в культуру фибробластов приводит к снижению процента жизнеспособных клеток и к характерному изменению метаболического профиля, обусловленному ассоциированными с увеличением лактата прооксидантными процессами. Изменения метаболизма при добавлении пирувата имели скомпенсированный характер и не оказывали влияния на жизнеспособность клеток. Необходимо отметить, что все исследуемые молекулы не вызывали цитотоксического или протективного действия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа посвящена изучению роли естественных интермедиатов – переключателей обмена веществ в межмолекулярных взаимодействиях. Методами компьютерного моделирования был выявлен полный спектр

биологической активности для оксалоацетата, малата, пирувата и лактата, а также охарактеризованы белки-партнёры по взаимодействию. Показано, что естественные интермедиаты являются промежуточными соединениями метаболизма, точками пересечения многих метаболических путей обмена белков, углеводов, липидов, выполняют вместе с тем координационную роль в функционировании и модулировании медиаторного, гормонального, рецепторного ответов, иммунологических, воспалительных, антибактериальных и противовирусных реакций, обладая антиканцерогенным действием. Вышеизложенное позволяет рассматривать естественные интермедиаты не только как регуляторы базовых метаболических путей, но и предположить возможность их влияния на один из ключевых механизмов организма – белок-белковое взаимодействие.

Серия исследований *in vitro* по изучению влияния пирувата и лактата с использованием экспериментальной модели гликопротеинов А и В и анти-А, анти-В антител с применением конфокальной микроскопии показала участие изучаемых малых молекул в белок-белковых взаимодействиях. Отмечено влияние на гликопротеин А в удлинении времени образования белковых комплексов, усилении процесса агрегации, что выражается в увеличении числа комплексов, их площади и средней интенсивности пикселя по зеленому цвету. Наблюдается ингибиторный эффект вступления в реакцию антиген-антитело гликопротеина В, что связано с уменьшением числа образованных комплексов, их площади и средней интенсивности пикселя по зеленому цвету. Полученные различия могут быть объяснены с позиции химической структуры: антигены А и В отличаются терминальными детерминантами: у антигена А - N-ацетилгалактозамин, у антигена В – D-галактоза. С одинаковой степенью интенсивности на введение пирувата и лактата реагируют детерминанты А и В АВ(IV) группы, что вероятно связано с особенностью строения – наличием двух антигенных детерминант и их межмолекулярным взаимодействием с малыми молекулами. Так как мембрана эритроцитов обладает отрицательным зарядом, то при взаимодействии с отрицательно заряженными малыми молекулами происходит изменение характера аффинитета связи белковых молекул. Таким образом, выявлено сонаправленное действие пирувата и лактата на антигенные детерминанты А и В, в том числе влияние лактата более выражено, чем пирувата, что также было спрогнозировано в программах PASS и STITCH.

Антиген-антительное взаимодействие является недостаточно изолированной системой из-за наличия ряда факторов, составляющих микроокружение эритроцит: многочисленных протеинов, рецепторов, которые неспецифически могут вступать в реакции с естественными интермедиатами. Для дальнейшего изучения влияния малых молекул на белковые структуры нами было выбрано

проведение экспериментов с участием изолированных систем, монокаталитических белков, обладающих свойствами и функциями, поддающимися количественной оценке.

Методами дифференциальной сканирующей флуориметрии и микрокапиллярного термофореза нами был установлен факт взаимодействия глицерофосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы с лигандами эндогенного происхождения и показано наличие изменения конформационной стабильности ферментов, а также функциональной активности при воздействии на них пируватом, лактатом, оксалоацетатом, малатом. Также, нами было выявлено, что концентрации метаболитов 0,5-1 мкМ приводят к сворачиванию конформационной структуры белка, и как следствие к повышению термостабильности, обладая протекторным действием, а концентрации 16 мкМ, напротив, преимущественно разворачивают белковую молекулу, что проявляется в снижении его термостабильности. Выявлено дозозависимое действие оксалоацетата и малата на функционирование лактатдегидрогеназы, пирувата на работу малатдегидрогеназы.

В межмолекулярных процессах *in vivo* клеточной культуры, показано стимулирующее действие оксалоацетата и малата на первичную культуру дермальных фибробластов человека, что выражалось в увеличении параметров жизнеспособности клеток. Внесение лактата в культуру фибробластов приводит к снижению процента жизнеспособных клеток что обусловлено с прооксидантными процессами, ассоциированными с увеличением лактата.

Подводя итог вышеизложенным данным, можно заключить, что в ходе проведенных фундаментальных исследований были получены данные, свидетельствующие об участии пирувата, лактата, оксалоацетата и малата во внутри- и межклеточных взаимодействиях, в частности, белок-белковых и фермент-субстратных. Показан широкий функциональный потенциал малых молекул на регуляцию метаболической функции. Показанные изменения количественного состава эндо- и экзометаболизма, а также жизнеспособности фибробластов под влиянием интермедиатов свидетельствует о возможности проявлять регуляторную роль и эффективно переключать энергетические потоки клетки, сохраняя внутренний гомеостаз и даже оптимизируя метаболизм под влиянием внешних факторов.

Являясь естественными компонентами эндосреды клетки, даже введенные экзогенно, изучаемые малые молекулы обладают низким профилем цитотоксичности, что открывает перспективы для дальнейшего изучения в качестве терапевтических средств. Широкий функциональный потенциал изучаемых малых молекул – переключателей обмена веществ является перспективным инструментом для постижения молекулярной основы здоровых и патологических состояний. На сегодняшний день остается широкий простор

для научной мысли и новых исследований, которые, безусловно, необходимы не только с позиции фундаментальной науки, но и новейших подходов современной медицины: таргетная терапия, в частности, онкологических заболеваний, индивидуальная метаболическая карта для персонализированной превентивной медицины, что может сыграть существенную роль для развития биоэнергетической и митохондриальной медицины (рисунок 8).

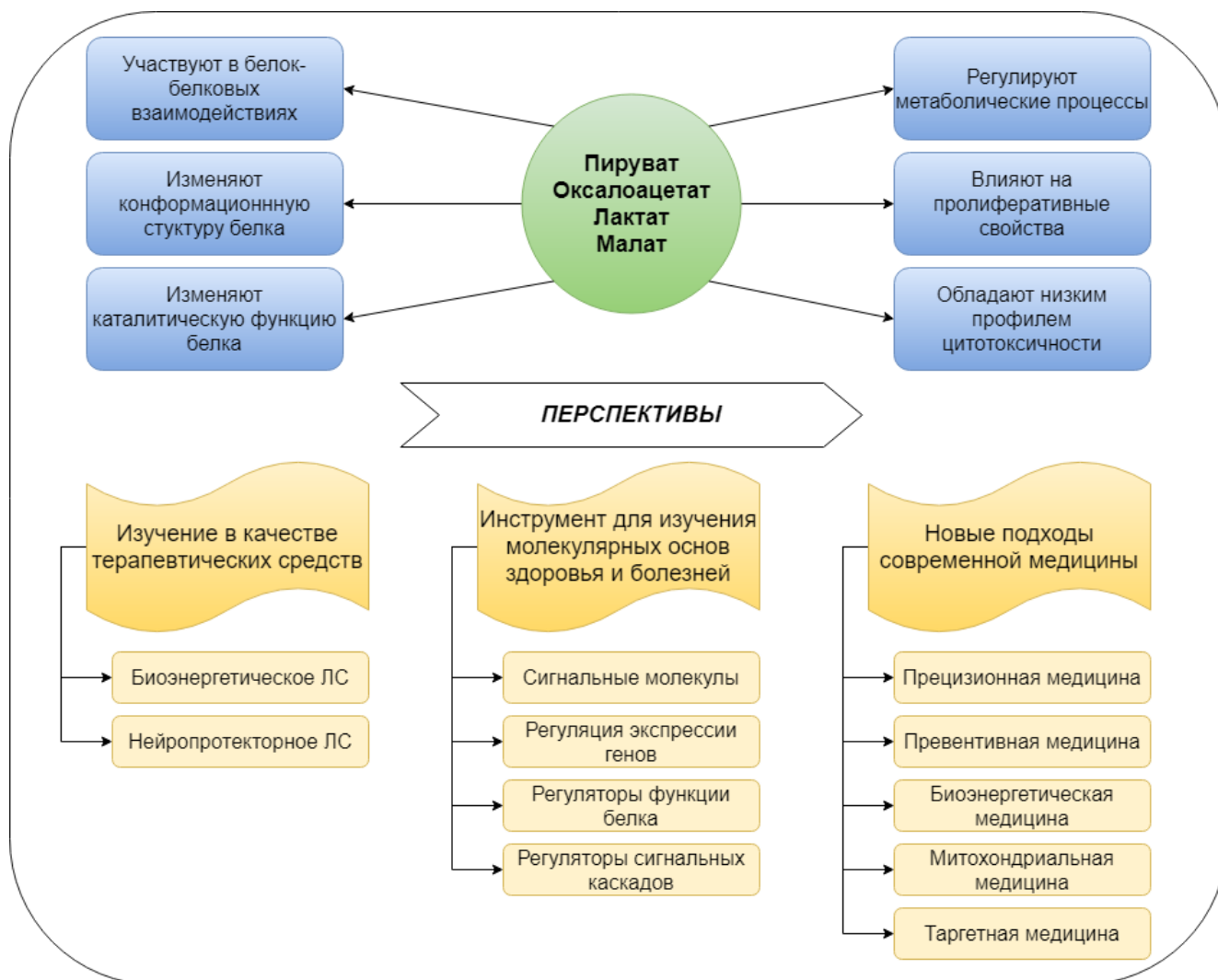


Рисунок 8 – Перспективы применения малых молекул (авторский рисунок)

ВЫВОДЫ

1. С использованием методов моделирования с использованием платформ PASS и STITCH выявлен широкий спектр биологической активности для пирувата, лактата, оксалоацетата и малата, охарактеризованы белки-партнёры по взаимодействию. Показано, что изучаемые метаболиты являются точками пересечения многих метаболических путей обмена белков, углеводов, липидов, выполняют вместе с тем координационную роль в функционировании и модулировании медиаторного, гормонального, рецепторного ответов,

иммунологических, воспалительных, антибактериальных и противовирусных реакций, обладая антиканцерогенным действием.

2. Установлено влияние пирувата и лактата на белок-белковое взаимодействие молекулярной модели групп крови АВ0. Выявлено сонаправленное действие пирувата и лактата на антигенные детерминанты А и В, анти-А, анти-В антитела. Установлено удлинение времени вступления во взаимодействие белковых структур с углеводными компонентами N-ацетилгалактозамина: А А(II) на 40% ($p < 0,001$), гликопротеина А АВ(IV) на 51,6% ($p < 0,0001$), преимущественно с лактатом, пируват в меньшей степени замедлял образование комплексов.

3. Визуализация белковых комплексов конфокальной микроскопией и последующий количественный анализ показал, что инкубация гликопротеина А с малыми молекулами приводит к усилению процесса агрегации, что выражается в увеличении числа комплексов, их площади и средней интенсивности пикселя по зеленому цвету, при этом эффект лактата выражен сильнее, чем пирувата. Наблюдается ингибиторный эффект метаболитов на гликопротеин В, что связано с уменьшением числа образованных комплексов, их площади и средней интенсивности пикселя по зеленому цвету.

4. Установлены взаимодействия глицерофосфатдегидрогеназы с пируватом, лактатом, оксалоацетатом, малатом. С использованием метода микрокапиллярного термофореза, были описаны равновесные константы диссоциации для взаимодействующих веществ. Показано достаточно сильное сродство лактата к молекуле глицерофосфатдегидрогеназы и более слабый аффинитет связи к другим малым молекулам – пирувату, оксалоацетату, малату.

5. С применением микрокапиллярного термофореза выявлены взаимодействия лактатдегидрогеназы с пируватом, лактатом, оксалоацетатом, малатом. Константы диссоциации для окислительно-восстановительной пары лактат-пируват, которые являются субстратами для лактатдегидрогеназы, показывают максимально высокое сродство к молекуле белка, по сравнению с парой оксалоацетат-малат.

6. Показано изменение конформации молекулы глицерофосфатдегидрогеназы после инкубации с пируватом, лактатом, оксалоацетатом, малатом. Конечные концентрации 0,5-1 мкМ метаболитов увеличивают термостабильность белка, 16 мкМ концентрации снижают термостабильные свойства. При постановке фермент-субстратных реакций отмечается изменение функциональной активности глицерофосфатдегидрогеназы после взаимодействия с интермедиатами в диапазоне концентраций.

7. Выявлено изменение конформационной структуры лактатдегидрогеназы при влиянии пируватом, лактатом, оксалоацетатом, малатом. Конечные концентрации 0,5-1 мкМ биологически активных соединений увеличивают термостабильность каталитических белков, более высокая конечная концентрация (16 мкМ) метаболитов снижает термостабильные свойства.

8. Установлено влияние малых молекул на функционирование лактатдегидрогеназной системы. Миллимолярные концентрации оксалоацетата и малата ингибируют функцию лактатдегидрогеназы, микромолярные концентрации оказывают активирующее действие на активность каталитического белка. При межгрупповом сравнении пары метаболитов оксалоацетат – малат показано, что ингибирующее действие малата в концентрациях 0,1 мМ ($p=0,0013$), 1 Мм ($p< 0,0001$), 1,5 Мм ($p< 0,0001$), 2 мМ ($p< 0,0001$) выражено сильнее.

9. Показано влияние малых молекул на пролиферативные свойства дермальных фибробластов человека. Оксалоацетат на 27,3% ($p=0,019$) и малат на 33,8% ($p=0,028$) увеличивают жизнеспособность культуры клеток дермальных фибробластов, что находит свое отражение в изменении содержания метаболитов и активности ферментов в супернатанте и лизате клеток.

10. Лактат изменяет метаболитный профиль культуры клеток фибробластов, запуская прооксидантные процессы и снижая процент жизнеспособных клеток на 67,6% ($p=0,005$). Изменения метаболизма при добавлении пирувата имели скомпенсированный характер и не оказывали влияния на жизнеспособность клеток.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Молекулярная модель белок-белкового взаимодействия гликопротеинов А и В может быть применена для тестирования биологически активных соединений эндогенного происхождения, естественных интермедиатов, а также фармакологических соединений, в том числе ксенобиотиков.

2. При постановке высокочувствительных иммунологических методов лабораторной диагностики рекомендуется учитывать влияние низкомолекулярных метаболитов, находящихся в биологических средах (кровь, ротовая жидкость, моча, ликвор) на взаимодействие белков с лигандами, что может повлиять на результаты исследования, и привести к их искажению.

3. Необходимо учитывать изменения в фонде метаболитов крови, в частности, оксалоацетата, пирувата, лактата при физиологических и патологических процессах на результаты биохимических, иммуногематологических, иммунофлуоресцентных клинических исследований.

4. Рекомендуется автоматизировать метод определения цитотоксичности (ЛДГ-тест) биологически активных соединений эндо- и экзогенного происхождения в культуре клеток нормальных фибробластов человека.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Систематическое изучение взаимодействий белок - малая молекула помогут преодолеть разрывы в существующих регуляторных петлях клеточной передачи сигналов и послужат новыми целями для биологических исследований, так и для медицины в целом. Широкий функциональный потенциал изучаемых малых молекул – переключателей обмена веществ является перспективным инструментом для постижения молекулярной основы здоровых и патологических состояний. В частности, регуляторы метаболитов, связанных с изменениями структуры белков, могут обеспечить новые стратегии для потенциальных терапевтических вмешательств и развития прецизионной медицины, в том числе фармакогеномики с поиском наиболее актуальных точек приложения действия биологически активных соединений.

Оказывая множественные влияния не только на метаболизм, но и на системы внутри и межклеточного взаимодействия, остается достаточное количество нерешенных задач о функционировании, регулировании энергетического потенциала клетки, передачи сигнала, воспалительного ответа и межмолекулярном взаимодействии этих интермедиатов. На сегодняшний день остается широкий простор для научной мысли и новых исследований, которые, безусловно, необходимы не только с позиции фундаментальной науки, но и новейших подходов современной медицины: таргетная терапия, в частности, онкологических заболеваний, индивидуальная метаболическая карта для персонализированной превентивной медицины, что может сыграть существенную роль для развития биоэнергетической и митохондриальной медицины.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Белок–белковые взаимодействия в присутствии минорных компонентов метаболизма / Ф.Н. Гильмиярова, **Н.А. Колотьева**, Е.А. Шахнович [и др.] // Сборник тезисов III Международной научнопрактической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». – Казань, 2012. – С. 152-153.

2. *Антигены АВ0 системы / **Ф. Н. Гильмиярова, Н. А. Колотьева, Е. А. Шахнович** [и др.] // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. – 2013. – № 8. – С. 21–28.

3. *Минорные компоненты метаболизма в регуляции белок–белковых взаимодействий / Ф. Н. Гильмиярова, В. М. Радомская, Н. А. Колотьева [и др.] // Медицинский альманах. – 2013. – № 2(26). – С. 181–184.
4. *Ключевые показатели углеводного обмена у клинически здоровых людей с различной групповой принадлежностью крови по системе АВ0 / Ф. Н. Гильмиярова, Н. А. Колотьева, О. А. Гусякова [и др.] // Казанский медицинский журнал. – 2013. – Т. 94, № 5. – С. 672–674.
5. Минорные компоненты метаболизма в изучении белок–белковых взаимодействий / Ф. Н. Гильмиярова, О. А. Гусякова, Н. А. Колотьева [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – № 9. – С. 10.
6. Биологическая активность антигенных детерминант системы крови АВ0 / Ф.Н. Гильмиярова, Н.С. Нефедова, Н.А. Колотьева [и др.] // XVI Международная научная конференция «Здоровье семьи в XXI веке». – Лиссабон, 2013. – С. 83–86.
7. ***Пат. №2484480 Российская Федерация, МПК G01N 33/557 (2006.01), G01N 33/577 (2006.01). Способ оценки действия биологически активных веществ на антиген–антительное взаимодействие / Гильмиярова Ф.Н., Радомская В.М., Шахнович Е.А., Колотьева Н.А., Нефедова Н.С., Рыскина Е.А. : заявитель и патентообладатель. – Е.А. Шахнович. – № 2012115145/15; заявл. 16.04.2012; опубл. 10.06.2013; Бюл. № 16. – 5 с.
8. **The Effect of Pyruvate on Antibody Interaction with Group Specific Erythrocyte Antigens / F. N. Gylmiyarova, V. M. Radomskaya, N. A. Kolotyeva [et al.] // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2014. – Vol. 8. – P. 260–266.
9. **Влияние пирувата на взаимодействие антител с группоспецифическими антигенами эритроцитов / Ф. Н. Гильмиярова, В. М. Радомская, Н. А. Колотьева [и др.] // Биомедицинская химия. – 2015. – Т. 61, № 1. – С. 132–140.
10. Прогнозируемые и экспериментально подтвержденные особенности гликопротеинов А и В системы крови АВ0 в формировании вариабельности метаболизма / Ф. Н. Гильмиярова, В. М. Радомская, Н. А. Колотьева [и др.] // Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е. А. Строева. Материалы Всероссийской научно–практической конференции студентов и молодых специалистов с международным участием. – Рязань, 2016. – С. 115–119.
11. Role of the metabolic minor components in the regulation of intermolecular interaction / F. Gilmiyarova, N. Kolotyeva, V. Radomskaya [et al.] // Journal of Biosciences and Medicines. – 2016. – № 4. – P. 28–35.
12. Intermolecular interaction of proteins and small molecules / E. A. Ryskina, N. A. Kolotyeva, F. N. Gilmiyarova, N. N. Chernov // European journal of natural history. – 2016. – № 3. – P. 8–13.

13. Визуализация антиген–антительного взаимодействия с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии / **Н. А. Колотьева**, Ф. Н. Гильмиярова, П. Е. Тимченко [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 8. – С. 713–718.
14. Роль естественных интермедиаторов в межмолекулярном взаимодействии белковых структур / Ф. Н. Гильмиярова, В. М. Радомская, **Н. А. Колотьева** [и др.] // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2016. – № S2. – С. 105.
15. Интермедиаты в регуляции межмолекулярного взаимодействия в лигандных технологиях / Ф. Н. Гильмиярова, В. М. Радомская, **Н. А. Колотьева** [и др.] // Лаборатория. – 2016. – № 1. – С. 11–12.
16. *Лактат: есть ли тупик метаболизма? / **Н. А. Колотьева**, В. И. Потехина, И. В. Горбачева, А. В. Козлов // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2016. – № 1. – С. 28–32.
17. *Структурно–регуляторный потенциал лактата / Ф. Н. Гильмиярова, **Н. А. Колотьева**, Е. А. Рыскина [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 2. – С. 78–88.
18. Мир малых молекул: роль в межмолекулярном взаимодействии белковых структур / Ф. Н. Гильмиярова, Е. А. Рыскина, **Н. А. Колотьева**, В. И. Потехина // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2017. – № 9. – С. 101–104.
19. Потехина, В. И. Визуализация взаимодействия минорных компонентов метаболизма с белковыми структурами / В. И. Потехина, **Н. А. Колотьева** // Аспирантские чтения – 2017. – Самара: Офорт, 2017. – С. 220–221.
20. Visualization of protein structures interaction European / F. N. Gilmiyarova, **N. A. Koloteva**, V. I. Potekhina [et al.] // Journal of Natural History. – 2017. – N 5. – P. 3–6.
21. *Белок–лигандные взаимодействия: влияние минорных компонентов метаболизма / Ф. Н. Гильмиярова, Е. А. Рыскина, **Н. А. Колотьева** [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. – 2017. – № 6(108). – С. 12–21.
22. Прогнозируемая и экспериментально подтвержденная роль пирувата и лактата в межмолекулярном взаимодействии белковых структур / Ф. Н. Гильмиярова, В. М. Радомская, **Н. А. Колотьева** [и др.] // Здоровье, демография, экология финно–угорских народов. – 2017. – № 3. – С. 58–60.
23. *Роль лактата в межмолекулярной регуляции взаимодействия белковых структур / Ф. Н. Гильмиярова, **Н. А. Колотьева**, В. И. Потехина [и др.] // Медицинский Альманах. – 2017. – № 2. – С. 99–101.
24. Биомолекулы и взаимодействие между ними / Е. А. Рыскина, Ф. Н. Гильмиярова, **Н. А. Колотьева** [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2017. – № 6–1. – С. 97–101.
25. Визуализация взаимодействия белковых структур / Ф. Н. Гильмиярова, О. А. Гусякова, **Н. А. Колотьева** [и др.] // Acta Naturae. – 2017. – Спецвыпуск. – С. 75.

26. Abo–blood groups system and morbidity / F. Gilmiyarova, V. Radomskaya O. **N. Kolotyeva** [et al.] // European journal of natural history. – 2017. – № 1. – P. 14–20.

27. Гильмиярова, Ф.Н. Визуализация взаимодействия интермедиатов малой молекулярной массы со структурами белковой природы / Ф. Н. Гильмиярова, **Н. А. Колотьева**, В. И. Кузьмичева // Материалы XV международной научно-практической конференции. Наука в современном информационном обществе. – North Charlston: CreateSpace Independent Publishing Platform, 2018. – С. 50–53.

28. Кузьмичева, В.Н. Структурно-функциональный потенциал лактата: влияние на антиген-антительное взаимодействие / В.И. Кузьмичева, **Н.А. Колотьева**, Ф.Н.Гильмиярова // Сборник научных трудов V международной конференции "Постгеном-2018", 2018 – С. 141.

29. Рыскина, Е.А. Влияние этанола на белок–лигандное взаимодействие / Е.А. Рыскина, Ф.Н. Гильмиярова, **Н.А. Колотьева** // II Объединенный научный форум, VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России, IX Российский симпозиум «Белки и пептиды». Научные труды. – Москва: Перо, 2019. – Т. 2. – С. 83.

30. **Колотьева, Н. А.** Изучение свойств малых молекул in silico / **Н.А. Колотьева**, О.И. Мелешкина // Материалы XVII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов, посвященной 75-летию Южно-Уральского государственного медицинского университета. – Челябинск, 2019. – С. 61–63.

31. ****Колотьева, Н. А.** Роль малых молекул в регуляции обмена веществ (обзор литературы) / **Н. А. Колотьева, Ф. Н. Гильмиярова** // Клиническая лабораторная диагностика. – 2019. – № 64(12). – С. 716–722.

32. Кузьмичева, В. И. Лактат – не только метаболит, но и участник антиген-антительных взаимодействий / В. И. Кузьмичева, **Н. А. Колотьева**, Ф. Н. Гильмиярова // Медицинская биохимия – от фундаментальных исследований к клинической практике. Традиции и перспективы. – Тюмень: Айвекс, 2019. – С. 77.

33. ****Группа крови как предиктор гликемии и лактатемии у пациентов в критическом состоянии** / В. И. Кузьмичева, Ф. Н. Гильмиярова, **Н. А. Колотьева** [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2019. – № 64(4). – С. 216–220.

34. ***Секреторный статус ротовой жидкости по антигенам А и В здоровых добровольцев** / И. А. Селезнева, Ф. Н. Гильмиярова, **Н. А. Колотьева** [и др.] // Наука молодых (Eruditio Juvenum). – 2019. – № 7(4). – С. 548–556.

35. ABO Blood Group Antigens as a Model of Studying Protein-Protein Interactions / F. Gylmiyarova, E. Ryskina, **N. Kolotyeva** [et al.]. – London: Intech Open, 2019. – P. 63-77.

36. Неканонические функции минорных компонентов метаболизма: компьютерное моделирование и экспериментальное подтверждение / Ф. Н. Гильмиярова, Н. А. Колотьева, В. И. Кузьмичева [и др.] // II Объединенный научный форум, VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России, IX Российский симпозиум «Белки и пептиды». Научные труды. – Москва: Перо, 2019. – Т. 2. – С. 92.

37. ***Пат. №22698628 Российская Федерация, G01N 21/64. Способ выявления влияния низкомолекулярных биологически активных веществ на конформацию белка / Кузьмичева В.И., Гильмиярова Ф.Н., Колотьева Н.А., Рыскина Е.А., Ремизов В.В., Виноградова Д.С. ; заявитель и патентообладатель. – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Самарский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации. – № 2019118363; заявл. 13.06.2019; опубл. 28.08.2019; Бюл. № 25. – 11 с.

38. *** Пат. №2680408 Российская Федерация, G01N 33/53. Способ выявления влияния биологически активных веществ на аффинитет белок–лигандной связи / Колотьева Н.А., Ерещенко А.А., Кузьмичева В.И., Бородин И.А., Гильмиярова Ф.Н., Радомская В.М., Гусякова О.А., Игнатова Н.К., Балдина О.А. ; заявитель и патентообладатель. – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Самарский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации. – № 2018109670; заявл. 19.03.2018; опубл. 21.02.2019; Бюл. № 6. – 10 с.

39. Saliva as a Diagnostic Tool for AB0 Blood Group Determination / F. Gilmiyarova, V. Kuzmicheva, N. Kolotyeva [et al.] // Biomed. J. Sci. & Tech. Res. – 2020. – Vol. 26(5). – P. 20335–20339.

40. **Группы крови и болезни человека (обзор литературы) / Ф. Н. Гильмиярова, Н. А. Колотьева, В. И. Кузьмичева [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Т. 65, № 4. – С. 216–221.

41. **Novel approach to protein–protein interaction assessment / F. N. Gilmiyarova, N. A. Kolotyeva, V. I. Kuzmicheva [et al.] // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. – 2020. – Vol. 548 (2020). – 072046.

42. **Конформационные особенности лактатдегидрогеназы: влияние температурного фактора в присутствии малых молекул, математическая модель / Ф.Н. Гильмиярова, В.И. Кузьмичева, Н.А. Колотьева [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2020. – Т.19, №3. – С. 6-14.

43. *Фибробласты как объект изучения пролиферативной активности in vitro / В.И. Кузьмичева, Л.Т. Волова, Н.А. Колотьева [и др.] // Наука и инновации в медицине. – 2020. – Т.5(3). – С. 210-215.

* – Работа опубликована в журнале, включённом в Перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов

диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук.

**** – Работа опубликована в издании, входящем в международные реферативные базы данных и системы цитирования, рекомендованном ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук.**

***** – Патенты.**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ГГТП – гамма-глутамилтранспептидаза

ГФД – глицерофосфатдегидрогеназа

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

НАД⁺ – никотинамидадениндинуклеотид окисленный

НАДН – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

TP53 - ген транскрипционного фактора белка p53

ЩФ – щелочная фосфатаза

EIF4E - эукариотический фактор инициации трансляции 4E

ЕРО – эритропоэтин

HIF-1 α - индуцируемый гипоксией фактор-1

HMOX1 – ген гемоксигеназы

MPC - митохондриальный переносчик пирувата

PASS - Prediction of Activity Spectra for Substances - Прогноз спектров

активности веществ

SLC - семейство транспортёров растворённых веществ

STITCH - Search Tool for Interacting Chemicals - Инструмент поиска

взаимодействующих химических веществ

TNF - фактор некроза опухоли