

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Колотьева Наталия Александровна

МАЛЫЕ МОЛЕКУЛЫ – ПЕРЕКЛЮЧАТЕЛИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

03.01.04 – биохимия

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:
Заслуженный деятель науки РФ,
д.м.н., профессор
Гильмиярова Фрида Насыровна

Самара, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. МАЛЫЕ МОЛЕКУЛЫ – ПЕРЕКЛЮЧАТЕЛИ ОБМЕНОВ	20
1.1. Межмолекулярные взаимодействия	20
1.2. Глицерофосфат и диоксиацетонфосфат – переключатели углеводно-липидного обмена	26
1.3. Пируват – центральное звено метаболизма	41
1.4. Лактат – не тупик метаболизма	51
1.5. Оксалоацетат и малат - компоненты малат-аспартатного шунта	59
1.6. Биоэнергетическая и митохондриальная медицина	70
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	79
2.1 Материалы исследования	80
2.2. Компьютерное моделирование биологической активности малых молекул.....	82
2.3. Модель для изучения белок-белкового взаимодействия. Групповое определение крови по системе АВ0	84
2.4. Визуализация белковых комплексов с малыми молекулами с применением конфокальной микроскопии	88
2.5. Способ оценки с помощью микрокапиллярного термофореза взаимодействия каталитических белков с малыми молекулами	91
2.6 Изучение влияния малых молекул на конформационную структуру белка с применением дифференциальной сканирующей флуориметрии....	94
2.7 Изучение влияния малых молекул на фермент-субстратное взаимодействие.....	96
2.8. Влияние малых молекул на клеточную культуру фибробластов	97
2.9. Статистическая обработка данных.....	99
ГЛАВА III. БЕЛОК-БЕЛКОВОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ	101
3.1. Изучение <i>in silico</i> биологических свойств пирувата и лактата	101
3.1.1. Оценка биологической активности пирувата и лактата в программе PASS	101
3.1.2. Оценка вероятных белков-партнеров для пирувата и лактата в среде STITCH.....	110

3.2. Исследование белок-белкового взаимодействия на модели гликопротеинов групп крови АВ0 системы	120
3.3. Лазерная конфокальная микроскопия как технология биоимаджинга и количественной оценки межбелковых взаимодействий.....	129
ГЛАВА IV. ГЛИЦЕРОФOSFATДЕГИДРОГЕНАЗА И ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА – ОБЪЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С МАЛЫМИ МОЛЕКУЛАМИ	139
4.1. Компьютерное моделирование прогнозируемых биологических свойств оксалоацетата и малата.....	139
4.1.1. Оценка биологической активности оксалоацетата и малата в программе PASS.....	139
4.1.2. Изучение вероятных белков-партнеров для оксалоацетата и малата в среде STITCH	144
4.2. Конформационные изменения глицерофосфатдегидрогеназы при взаимодействии с пируватом, лактатом, оксалоацетатом и малатом.....	149
4.2.1. Метод капиллярного термофореза для установления факта взаимодействия глицерофосфатдегидрогеназы с пируватом, лактатом, оксалоацетатом и малатом	150
4.2.2. Изучение термолабильности глицерофосфатдегидрогеназы под влиянием пирувата, лактата, оксалоацетата и малата.....	152
4.3. Конформационные изменения лактатдегидрогеназы при взаимодействии с пируватом, лактатом, оксалоацетатом и малатом.....	158
4.3.1. Метод капиллярного термофореза для установления взаимодействия лактатдегидрогеназы с пируватом, лактатом, оксалоацетатом и малатом	158
4.3.2. Изучение термолабильности лактатдегидрогеназы под влиянием пирувата, лактата, оксалоацетата и малата	160
ГЛАВА V. ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНЫХ СИСТЕМ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ ЗОНДИРОВАНИИ МАЛЫМИ МОЛЕКУЛАМИ.....	170
5.1. Влияние малых молекул на функциональную активность глицерофосфатдегидрогеназы	1711
5.2. Влияние биологически активных соединений на действие лактатдегидрогеназной системы	175
5.3. Влияние биологически активных соединений на функционирование системы малатдегидрогеназа - лактатдегидрогеназа	182

ГЛАВА VI. КЛЕТОЧНАЯ КУЛЬТУРА ФИБРОБЛАСТОВ И МАЛЫЕ МОЛЕКУЛЫ	192
6.1 Особенности протекания метаболических процессов в культуре фибробластов при инкубации с малыми молекулами.....	193
6.2 Изучение влияния малых молекул на функционирование ферментативных систем фибробластов.....	204
6.3 Определение жизнеспособности фибробластов при культивировании с биологически активными соединениями	209
ГЛАВА VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	214
ВЫВОДЫ	239
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	239
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	243
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	244
ПРИЛОЖЕНИЯ	294

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; Н.М. Wilkins, R.H. Swerdlow, 2016; В. 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 нейропротекторного 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 1.1). 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; К.Е. Weck, 2018; P. Belenguer et al., 2019; A.J. Angelbello et al., 2020].

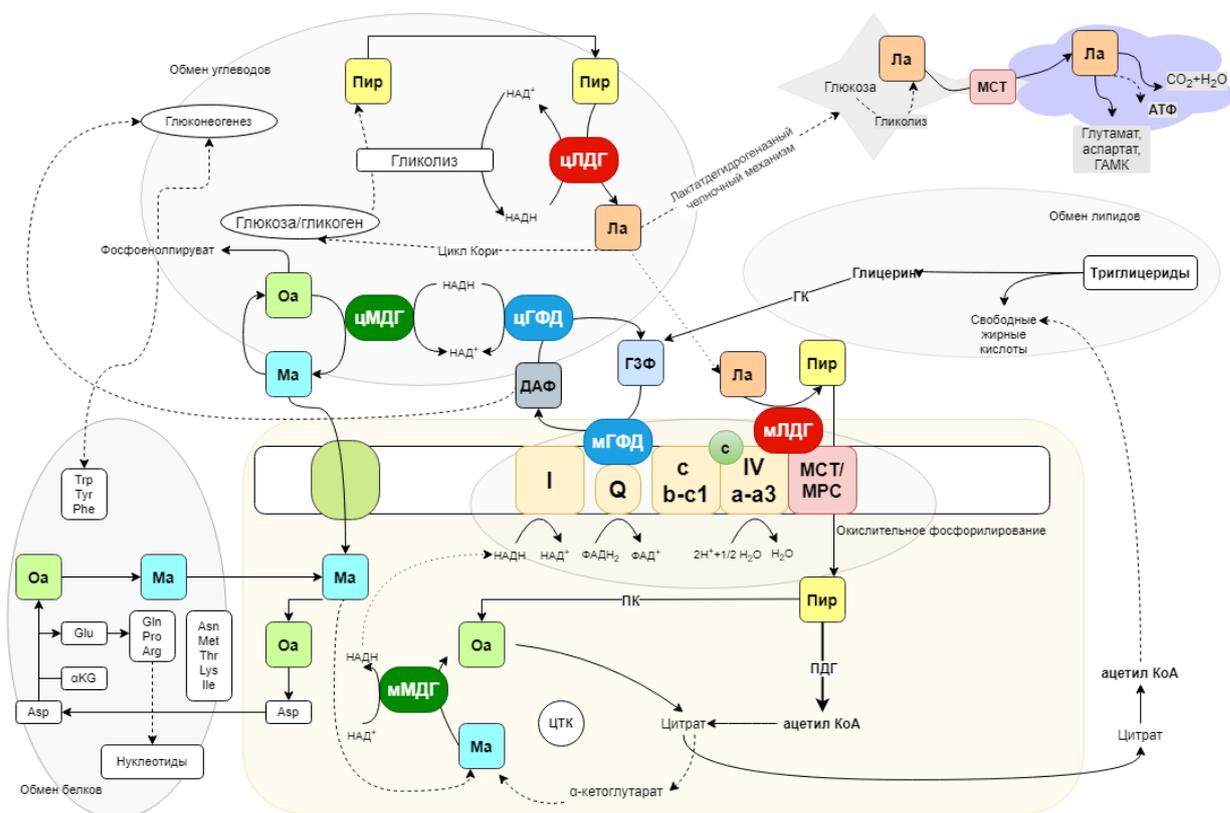


Рисунок 1.1 – Роль малых молекул в обмене веществ (авторский рисунок).

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; Е.А. 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 термолабильность 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. Окислительно-восстановительная пара лактат-пируват, которые являются субстратами для лактатдегидрогеназы проявили максимально высокое сродство к молекуле белка, по сравнению с парой оксалоацетат-малат.

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 В-сероссийской 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 позволил 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.

ГЛАВА I.
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.
МАЛЫЕ МОЛЕКУЛЫ – ПЕРЕКЛЮЧАТЕЛИ ОБМЕНОВ

1.1. Межмолекулярные взаимодействия

С классической биохимической точки зрения, большинство, если не все, биологические системы работают, как известно, с определенным набором функций белка. Понимание того, как тысячи функций белка организованы для поддержания жизни, является актуальным вопросом, и имеет огромное значение в исследованиях в области наук о жизни. Прорывы в технологии, такие как открытие ДНК, белковые микрочипы, глубокое секвенирование и масс-спектрометрия, позволили исследовать изменения во многих биологических процессах, в том числе между различными фазами клеточного цикла и внутри них. Использование систематического картирования взаимодействий белок-метаболит стало катализатором развития инновационных и эффективных стратегий протеомики или метаболомики, основанных на широкомасштабном масс-спектрометрическом анализе биомолекул. [K. Bingol et al., 2016, M. Luzarowski, A. Skirycz, 2019; T. Tsukidate et al., 2020]. Были построены обширные функциональные сети с целью расшифровки рабочих механизмов взаимодействия и ассоциаций между белком и различными видами малых молекул. Количество таких возможных взаимодействий может варьироваться от 3,5 до 43,7 миллионов [X. Li et al., 2013], и, вероятно, гораздо больше у высших организмов с более сложными механизмами роста и развития. Они включают в себя разные виды взаимодействий: белок-дезоксирибонуклеиновая кислота, например, в регуляции экспрессии генов, белок-рибонуклеиновая кислота - в регуляции транскрипции и процессинга РНК, белок-белковые взаимодействия в клеточном ответе [B. Zhang et al., 2018; S. Solier et al., 2020; S. Li, W. Shui, 2020].

В то время как другие три типа взаимодействий (белок-ДНК, белок-РНК, белок-белок) были хорошо документированы, изучение взаимодействий белок-малая молекула все еще сильно отстает как в общих, так и в систематических исследованиях, что измеряется количеством публикаций (рисунок 1.2). Лишь в 2009 году стали появляться первые публикации об изучении неспецифических взаимодействий белок-метаболит. Благодаря революционному прогрессу в науках о жизни, 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 [G.X. Yang et al., 2012; I.Piazza et al., 2018; W. Qin et al., 2020].

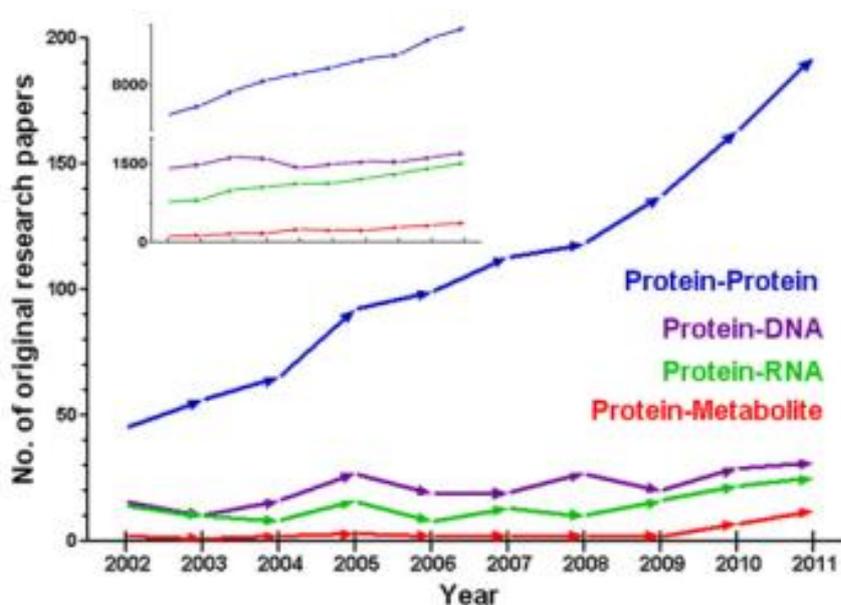


Рисунок 1.2 – Систематические исследования по каждой группе взаимодействий. На вставке показано количество всех публикаций по каждому типу молекулярных взаимодействий за тот же период (X. Li et al., 2013).

По литературным данным многие естественные метаболиты обладают структурным сходством с известными искусственными малыми молекулами и характеризуются по сходству размера (от 40 до 1000 Да) и химическим свойствам (гидрофобность легкой и средней степени). Малые молекулы, которые окружают протеины, могут связывать и изменять его биологические функции, такие как активность ферментов и интерактивность белков. Эти взаимодействия являются важным средством аллостерической регуляции ферментов и рецепторов [N.H. Shah, J. Kuriyan, 2019]. В то время как малые молекулы могут быть тесно связаны с их ферментными мишенями, метаболиты в сигнальных путях, вероятно имеют биохимическую значимость для своих белковых партнеров. Такие «неожиданные» молекулярные взаимодействия между белком и малыми молекулами были вовлечены во многие важные события передачи сигналов, и дают новое понимание клеточной регуляции и передачи сигналов. Например, циклические нуклеотиды и инозитолфосфаты, фосфоинозитолсвязывающие протеинкиназы, гликолитические ферменты [H.Zhu, 2001], регуляция стеролами протеинкиназ [X.Li, 2010], сфинголипидами актин-организующего белка [O.Gallego, 2010]. Такие взаимодействия, возможно, не легко было бы уловить без систематического подхода. Взаимодействия белков с малыми молекулами на этом уровне могут быть интегрированы в сеть взаимодействия, вместе с тем имеются сложности для понимания как каждый биологический процесс выполняется на молекулярном уровне [M. Luzarowski, A. Skirycz, 2019; N.H. Shah, J. Kuriyan, 2019; Н.А. Колотьева, Ф.Н. Гильмиярова, 2019].

Говоря о метаболизме - это биохимические реакции, в которых питательные вещества преобразуются для производства энергии, строительных блоков из биомассы и кофакторов. Было установлено, что скорость поглощения питательных веществ коррелирует с размером клеток и синтезом белка. Чтобы удовлетворить и согласовать эти требования,

необходим высокочувствительный, быстро адаптируемый и точно скоординированный тип регуляции. Это может быть достигнуто путем метаболической ауторегуляции, в частности, конкурентного торможения вследствие аллостерического взаимодействия, где метаболизм модулируется его собственными продуктами, то есть аллостерическими регуляторами [S.C. Dolfi et al., 2013].

Для поддержания метаболического гомеостаза важным является баланс между строительными блоками АТФ, восстановительным потенциалом и субстратами. Hitosugi T. с коллегами (2012) обнаружили, что 3- и 2-фосфоглицераты, которые взаимно преобразуются с помощью фосфоглицерат мутазы 1, связывают гликолиз с пентозофосфатным путем и биосинтезом серина. Имеются данные, что многие раковые клетки проявляют повышенную активность и экспрессию фосфоглицерат мутазы 1, которая потенциально направляет их метаболические потребности в неконтролируемую пролиферацию [D.L. Roberts et al., 2010; T. Hitosugi et al., 2012].

Интересным является факт, что регуляция между путем биосинтеза серина и гликолизом является двунаправленной. Было обнаружено, что серин может действовать как аллостерический активатор пируваткиназы 2 [B.Chaneton et al., 2012]. Таким образом, низкие уровни серина приводят к снижению активности пируваткиназы M2 и, следовательно, к накоплению верхних гликолитических интермедиатов. Это, в свою очередь, обеспечивает повышенные концентрации субстрата для биосинтетических путей, которые разветвляются из гликолиза [S.Y. Lunt et al., 2015].

Было показано, что изменения в активности цепи переноса электронов влияют на поступление пирувата в цикл трикарбоновых кислот через пируватдегидрогеназу [S.M. Fendt et al., 2013], что является механизмом контроля для направления метаболитов в разные метаболические пути. Подобно судьбе пирувата, судьба глутамина при входе в цикл

трикарбоновых кислот через α -кетоглутарат регулируется соотношением метаболитов. Низкое соотношение НАДФ⁺/НАДФН и высокое соотношение α -кетоглутарат/цитрат способствуют восстановительному карбоксилированию α -кетоглутарата до цитрата. Взаимодействие между НАДН-продуцирующей сукцинил-КоА-синтазой и никотинамид-нуклеотид-трансгидрогеназой может обеспечить достаточные количества НАДФ для стимулирования восстановительного метаболизма глутамина [A.R. Mullen et al., 2014].

Низкомолекулярные метаболиты играют важную роль в регуляции функций белков, на которые действуют либо ковалентные неферментативные посттрансляционные модификации, либо нековалентные связывающие взаимодействия. Как известно, посттрансляционные модификации ферментов представляют собой химические изменения белковых остатков путем ковалентных связей функциональных групп. Как известно, они могут быть классифицированы на обратимые: гликозилирование, пальмитоилирование, рибозилирование поли-АДФ, фосфорилирование, сукцинирование, метилирование, ацетилирование, убиквитинирование, карбоксилирование, тиолирование (нитрозилирование, глутатионилирование), гидроксипирование и необратимые: сукцинирование, прениляция, миристоилирование, протеолиз, образование изопептидной связи. С помощью обратимых модификаций происходит динамическая модуляция активности протеинов в ответ на внешние и внутренние сигналы, в свою очередь, необратимые связаны с синтезом и деградацией белка, мембранным нацеливанием и межбелковым взаимодействием [C.T. Walsh et al., 2005; W. Qin et al., 2020].

Таким образом, центральный углеродный обмен обеспечивает предшественники, необходимые для добавления посттрансляционных модификаций к белкам и для модификации ДНК. Было проанализировано, что модификации гистонов и ДНК (главным образом, метилирование)

приводят к эпигенетическим изменениям, и зависят от метаболизма [W.G. Kaelin, and S.L. McKnight 2013; A.Carrer and K.E. Wellen 2014]. Тем не менее, метаболические ферменты сами являются мишенями для посттрансляционных модификаций, что приводит к обратной регуляции метаболизма [D.Lorendeau et al., 2015; K.E. Weck, 2018; A.J. Angelbello et al., 2020].

Было доказано, что значительное количество метаболических ферментов подвержено множественным посттрансляционным модификациям. В частности, одна треть сайтов ацетилирования в клетках человека в свое время являются сайтами убиквитинирования, что приводит к конкуренции между двумя видами модификаций для регуляции стабильности белка [S.A.Wagner, et al., 2011].

Как известно, метаболизм играет центральную роль в жизни микро- и макро- организмов, и он подпитывает все клеточные действия строительными блоками и энергией. Учитывая большую и плотно связанную сеть метаболитов, ферментативных реакций и регуляторных взаимодействий, актуальным является изучение взаимосвязанной метаболической и регуляторной сети во всей ее полноте [L.Gerosa, U.Sauer, 2011]. Ключом к идентификации регуляторных цепей, которые действуют через метаболизм и его регуляторные сети, являются методы и подходы для количественной оценки метаболических потоков, концентраций метаболитов, содержания и активности белка, а также ферментативных систем, которые регулируют синтез макроэргических соединений [J.R. Heinemann Karr et al., 2012; V.Chubukov et al., 2014; S. Solier et al., 2020; T. Tsukidate et al., 2020].

Мы посчитали возможным обратиться к метаболитам: диоксиацетонфосфат, глицерофосфат, пируват, лактат, оксалоацетат, малат и ферментным системам: лактатдегидрогеназа глицерофосфатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, катализирующим их превращения и изучить их роль в регуляции белок-белковых межмолекулярных взаимодействий.

1.2. Глицерофосфат и диоксиацетонфосфат – переключатели углеводно-липидного обмена

Глицерофосфат находится на пересечении метаболизма углеводов и липидов, доступность этого метаболита может регулировать энергетический и промежуточный метаболизм в клетках млекопитающих [S.V. Stepanian et al., 2003; S.C. Brito et al., 2006; R.Zechner et al., 2012].

Образующийся из глюкозы во время гликолиза глицерофосфат, является исходным субстратом для цикла глицеролипид / свободная жирная кислота и находится на перекрестке метаболизма глюкозы и липидов. Образованный за счет цитозольной глицерол-3-фосфат-дегидрогеназы глицерофосфат участвует в глицерофосфатном челноке для переноса восстанавливающих эквивалентов в митохондриальную цепь переноса электронов. Цикл глицеролипид / свободная жирная кислота генерирует молекулы, которые играют сигнальную и регуляторную роль во многих биологических процессах, таких как секреция инсулина, чувствительность к инсулину, термогенез, воспаление, а также выживание и пролиферация клеток, в том числе в раковых клетках [M. Prentki et al., 2008].

Недавние исследования показывают, что канцерогенез зависит не только от гликолиза, но и от липидного обмена, что открыло новое терапевтическое окно для лечения рака. Таким образом, контроль уровня глицерол-3-фосфата в клетке может предложить механизм, с помощью которого многие патогенные пути, вовлеченные в ожирение, сахарный диабет 2 типа, а также в пролиферацию раковых клеток, могут быть замедлены [M.G. Vander Heiden 2011; M.Prentki et al., 2012].

В отличие от микроорганизмов, низших эукариот и некоторых растений, которые содержат глицерол-3-фосфат фосфатазу [J.A. Caparros-Martin et al., 2007; S.N. Lindner et al., 2012; G. Larrouy-Maumus et al., 2013], ранее не было известно существование фермента в клетках млекопитающих, который непосредственно высвобождает глицерин из глицерол-3-фосфата, хотя были

некоторые указания на наличие такой фосфатазы [J.A. Raymond et al., 2015; M.Romero Mdel et al., 2015]. В клетках животных глицерин вырабатывается не только при липолизе триацилглицеринов. Исследования на печени крысы показали наличие субстратного цикла между внеклеточным глицерином и триозо-3-фосфатами печени, и что этот субстратный цикл, вероятно, включает гидролиз глицерофосфата [E. Possik et al., 2017].

Было обнаружено что фосфогликолатфосфатаза в клетках млекопитающих фактически функционирует как глицерол-3-фосфатфосфатаза и участвует в регуляции уровней глицерол-3-фосфата в клетке и метаболизме глюкозы, липидов и энергии. Метаболит 2-фосфогликолат является продуктом процесса расщепления и восстановления ДНК и участвует в регуляции аффинности связывания гемоглобина с кислородом в эритроцитах млекопитающих. Это связано с тем, что 2-фосфогликолат является мощным активатором 2,3-бисфосфоглицератфосфатазы, фермента, который, как известно, регулирует связывание кислорода с гемоглобином [Y. Mugabo et al., 2016].

Глицерол-3-фосфатфосфатаза с высоким уровнем экспрессии определяется в яичке, сердечной и скелетной мышцах, печени и островках. У мышцей было обнаружено, что экспрессия глицерол-3-фосфатфосфатазы регулируется состоянием питания. Диета с высоким содержанием жиров привела к увеличению экспрессии мРНК и белка глицерол-3-фосфатфосфатазы в сердце и коричневом жировом слое и уменьшению экспрессии в скелетных мышцах и висцеральном жировом слое [S.V. Stepanian et al., 2003; E.Possik et al., 2017]. Уровень экспрессии глицерол-3-фосфатфосфатазы связан с изменениями в метаболизме глюкозы, липидов и энергии в В-клетках, поскольку глицерол-3-фосфат находится на перекрестке липидного и углеводного обменов [Y. Mugabo et al., 2016; E. Possik et al., 2017].

В конце XX века учеными F. John Ballard и Richard W. Hanson был открыт путь метаболизма липидов, который получил название глицеронеогенез – синтез липидов из органических остатков, отличных от глюкозы и глицерина. Толчком к этому открытию послужили работы M.F. Utter и его коллег, которые в течение пяти лет открыли два ключевых фермента глюконеогенеза: пируваткарбоксилазу [M.F. Utter, D.B. Keech, 1963] и фосфоенолпируват-карбоксикиназу [M.F. Utter, K. Kurahashi, 1954]. Опираясь на эти работы, ученые анализировали ферментный состав белой жировой ткани. К их удивлению, наряду с высоким содержанием пируваткарбоксилазы, также было установлено высокое содержание фермента фосфоенолпируваткарбоксилазы, который в последствии оказался важнейшим регулятором активности процессов глицеронеогенеза. Количество фермента превосходило содержание его в печени, где активно протекают реакции глюконеогенеза [F.J. Ballard, R.W. Hanson, 1967]. В этом же году независимо от описанных открытий, Lea Reshef и ее научная команда доложили о синтезе липидов из прекурсоров, отличных от глюкозы и глицерина, а именно – пирувата [L. Reshef et al., 1967]. Однако, эти открытия не получили признания в широких научных кругах, и потому работа над данным направлением была приостановлена почти на четверть века.

В конце второго тысячелетия было сделано заявление о том, что глицеронеогенез протекает не только в белой и бурой жировой тканях, но и в печени, в которой отмечается активность другого фермента, ответственного за метаболизм липидов - глицеринкиназы, что заставило задуматься о фундаментальном значении процесса [L.M. Votion, 1998]. Сегодня известно, что глицеронеогенез – обязательный элемент цикла триглицериды-жирные кислоты в тканях млекопитающих. Ингибирование данного пути приводит к липодистрофии, а избыточная активация – к ожирению [J. Zhang et al., 2011]. Показано, что во время голодания большое количество свободных жирных кислот высвобождается из жировой ткани и повторно рэтерифицируется в

триглицериды. Это происходит в печени, жировой и мышечной тканях. Несмотря на это, даже после понимания биологического механизма данного цикла, он по-прежнему классифицируется некоторыми учеными как «холостой». Подсчитано, что повторное использование молекулы триглицерида обходится клетке в 3% от общего количества энергии, в связи с чем уместно сравнение жировой ткани с коммерческим банком, взимающим комиссионные за выдачу наличных средств, что объясняет физиологическую роль данного цикла с позиции обеспечения энергией в моменты голодания и нехватки энергетических субстратов и выводит его из разряда «холостых» [R.W. Hanson et al., 2006].

Стоит отметить, что, принимая во внимание высокий уровень метаболизма глюкозы в мышцах и тот факт, что 85% инсулин-опосредованного поступления глюкозы приходится именно на поперечно-полосатую мышечную ткань, участие глюкозы в синтезе липидов в этой ткани минимальна. Отчасти, это может быть связано с низкой концентрацией триглицеридов в мышцах - в пределах 2-3 ммоль/г ткани. Путь меченых атомов водорода глюкозы в процессе синтеза липидов невозможно проследить, поскольку они участвуют в образовании метаболической воды, однако, меченые атомы углерода той же молекулы находили в 20% вновь синтезированных продуктах (триглицериды, глицерофосфат), что свидетельствует о непрямом участии глюкозы в этом процессе [C.K. Nye et al., 2008].

Изучение глицеронеогенеза получило свое продолжение на уровне лиганд-белкового взаимодействия. Установлено, что семейство ядерных белков PRAR экспрессируется во многих тканях и органах и в настоящее время является мишенью фармакологических препаратов, например, фенофибрата и ципрофибрата. Однако, конкретные лиганды, посредством которых белки семейства PRAR контролируют процесс адипогенеза, оставались неясными. В исследовании *in silico* было подтверждено, что белок

PRAR- α способен взаимодействовать с такими лигандами, как α -глицерофосфат, дигидроксиацетонфосфат и глицеральдегид-3-фосфат, которые имеют высокий аффинитет связи и оказывают активирующее влияние [P.A. Subramani et al., 2013].

Дигидроксиацетонфосфат является окислительно-восстановительным партнером глицерофосфата, и представляет собой, как известно, один из метаболитов гликолиза, образующийся на этапе расщепления фруктозо-1,6,-бисфосфата альдолазой на две триозы: кетозу – собственно дигидроксиацетонфосфат, и альдозу – глицеральдегид-3-фосфат. Равновесие реакции смещено в сторону образования дигидроксиацетонфосфата, и это имеет высокий биологический смысл: при недостатке энергии эта молекула изомеризуется в глицеральдегид-3-фосфат и продолжает свой путь в гликолитическом процессе, при достаточном количестве энергии дигидроксиацетонфосфат может вступать на путь биосинтеза липидов, превращаясь в α -глицерофосфат. Также этот интермедиат является субстратом для глюконеогенеза. Кроме этого, дигидроксиацетонфосфат косвенно участвует в метаболизме этанола. Поскольку, используя алкогольдегидрогеназный путь обезвреживания этанола, накапливаются восстановленные переносчики НАДН, клеточные реакции, сопровождающиеся потреблением НАДН протекают активнее, как-то: превращение пирувата в лактат, дигидроксиацетонфосфата в α -глицерофосфат [Ф.Н. Гильмиярова и др., 2013; Н.А. Колотьева, 2019].

Таким образом, глицерофосфат и дигидроксиацетонфосфат представляют собой ключевые интермедиаты - переключатели, находящиеся на пересечении метаболических путей обмена углеводов и липидов, доступность этих метаболитов может регулировать энергетический и промежуточный метаболизм млекопитающих. Все перечисленные выше многочисленные функции окислительно-восстановительных партнеров обеспечиваются работой фермента глицерофосфатдегидрогеназы.

Глицерофосфатдегидрогеназа (ЕС 1.1.1.8, ГФД), представляет собой НАД-зависимую дегидрогеназу, которая катализирует обратимое окислительно-восстановительное превращение дигидроксиацетонфосфата и НАДН в глицерофосфат и НАД⁺. Реакционный баланс сильно склоняется к образованию глицерофосфата в физиологических условиях. Глицерофосфатдегидрогеназа человека является одним из трех изоферментов глицерол-3-фосфатдегидрогеназы, проявляющих тканеспецифическую экспрессию. Дигидроксиацетонфосфат - промежуточный продукт пути гликолиза Embden-Meyerhof, восстанавливается до глицерол-3-фосфата с окислением НАДН, который в основном также генерируется из этого пути. Одним физиологическим эффектом этой реакции является предотвращение накопления дигидроксиацетонфосфата в организмах, который в противном случае может быть превращен в метилглиоксилат, токсичное соединение, которое специфически взаимодействует с белками в физиологических условиях [С. Comragno et al., 2001].

Глицерофосфатдегидрогеназа цитоплазмы действует совместно с митохондриальной глицерол-3-фосфатдегидрогеназой, чей баланс реакции направлен в противоположную сторону, ускоряя потоки источников углерода и уменьшая эквивалент в митохондриях. Другим физиологическим эффектом является повторное окисление НАДН до НАД⁺, которое будет повторно использоваться в пути Embden-Meyerhof для ускорения пути гликолиза. Эти эффекты имеют решающее значение для поддержания восстановительных условий в некоторых прокариотических организмах, особенно в тех, чей метаболизм веществ и энергии сильно зависит от пути гликолиза [М. Prentki et al., 2012].

Митохондриальная глицерофосфатдегидрогеназа флаavin-связанная в дыхательной цепи дегидрогеназа, которая окисляет глицерол-3-фосфат до дигидроксиацетонфосфата с одновременным окислением ФАД до ФАДН₂ и переносом электронов на коэнзим Q. Исследования по митохондриальной

глицерофосфатдегидрогеназе начались уже 75 лет назад [D.E. Green, 1936] и все же еще есть много вопросов, касающихся взаимосвязи структуры и функции, регуляции этого фермента. Интересно, что несмотря на высокую роль в клетке, данный фермент имеет весьма скромное представительство в геноме. Митохондриальная глицерофосфатдегидрогеназа млекопитающих кодируется единичным GPD2 геном, локализованным на хромосоме 2 у человека и хромосоме 3 у крыс. Это консервативный и медленно развивающийся ген млекопитающих показывает высокую степень родства с другими флаavin-связанными глицерол-3-фосфат дегидрогеназами. С другой стороны, нет гомологии с цитоплазматической НАД-связанной растворимой глицерол-3-фосфат дегидрогеназой, кодируемой геном GPD1, которая снижает количество дигидроксиацетонфосфата к глицерол-3-фосфату во время окисления цитозольного НАДН [T. Mracek, 2014]. Также отмечено, что генетические мутации, приводящие к выключению или повреждению фермента, не имеют значительных клинических проявлений, что объясняется компенсаторным усилением роли малат-аспартатного челночного механизма [A. Alfadda et al., 2004].

Экспрессия белка регулируется преимущественно на уровне транскрипции тканеспецифичным образом: в головном мозге, в яичке, в тканях щитовидной железы. Транскрипция активируется связыванием TR/RXR (рецептор гормона щитовидной железы / рецептор ретиноида X) с последовательностью TRE (элементы ответа гормонов щитовидной железы) в промоторной области гена GPD2. Трийодтиронин активирует синтез митохондриальной глицерофосфатдегидрогеназы в печени эутиреоидных и гипотиреоидных крыс. Имеются указания на период полураспада фермента около 60 часов, что указывает на относительно быстрый оборот этой дегидрогеназы по сравнению с другими белками митохондриальной внутренней мембраны [J.M. Weitzel, 2003; T. Mracek, 2005].

Митохондриальная глицерофосфатдегидрогеназа крыс синтезируется в виде предшественника весом 79 кДа, а после пересечения мембраны митохондрии происходит отщепление N-терминального конца весом 5 кДа. Ряд ученых пытались изолировать этот фермент, а затем выделили его в чистом виде из тканей крысы, свиньи и кролика, с различным содержанием нековалентно связанного ФАД, негемового железа и кислотно-неустойчивого сульфида [E.S. Cole, 1978; A. Garrib, 1986].

Fondy T. с коллегами в конце 60-х годов провели изучение никотинамид-адениндинуклеотид-связанной L-глицерол-3-фосфат-дегидрогеназы, кристаллизованной из мышцы кролика, крысы, пчелы, и определили аминокислотный состав, а также сравнение химических и физических определений молекулярной массы. Аминокислотный анализ позволил выявить наличие остатков тирозина, триптофана, аргинина, гистидина, цистеина или полуцистина и достаточно большой остаток лизина на минимальную молекулярную массу, которая составляла 30 133. [T. Fondy et al., 1968, 1969]

Кристаллическая структура глицерофосфатдегидрогеназы была описана X. Ou с соавторами в 2006 году с использованием методов многочастотной аномальной дифракции, кристаллографии. Кристаллографическая асимметричная единица содержит два мономера, которые образуют димер с некристаллографической 2-кратной осью. Фермент прикрепляется к мембране без трансмембранных завитков, Митохондриальная глицерофосфатдегидрогеназа тесно связана с внутренней мембраной, скорее, как периферийное устройство, чем интегральный белок. Эта точка зрения также подтверждается тем фактом, что фермент извлекается из мембраны с использованием карбонатов, и является периферийным, прикреплен к мембране с помощью гидрофобных связей. [M.J. Janssen, 2002]. Сэндвич-подобная структура домена, связывающего кофактор, является общей для дегидрогеназ, особенно для НАДФ-зависимых дегидрогеназ. Другой

характеристикой НАД-связывающего домена является наличие консервативного мотива во всех НАД-зависимых ГФД, которые были секвенированы до настоящего времени. С-концевой домен для связывания субстратов дигидроксиацетонфосфата или глицерол-3-фосфата в основном состоит из спиралей. Мономеры образуют плотно упакованный димер в кристаллографической асимметричной единице без существенных различий между субъединицами. Взаимодействия мономер-мономер в основном гидрофобны, было найдено 25 водородных связей между мономерами. Все структуры глицерофосфатдегидрогеназы, независимо от того, являются ли они структурой апофермента или сложными структурами, представляют собой замкнутую конформацию. Принимая во внимание общие черты, характерные для сульфатной и фосфатной групп, одной из вероятных причин является то, что сульфат вызывает закрытие кармана в структурах глицерофосфатдегидрогеназы. Кроме того, эта гипотеза подтверждена ферментативными данными, показывающими, что активность фермента полностью ингибируется 20 мМ сульфатом [X. Ou, 2006].

Был описан каталитический механизм для глицерофосфатдегидрогеназы, и показано, что активный сайт фермента содержит аргинин, лизин, аспарагин, аспарагиновую кислоту, треонин и образуют сеть водородных связей с центром на лизине. Эти данные позволяют предположить, что взаимодействия с распознаванием субстрата высоко консервативны во всех видах глицерофосфатдегидрогеназы с известной последовательностью [T. Mrasek, 2013]. Из работы Maret (2001) с коллегами было показано, что щелочной pH замедляет превращение дигидроксиацетонфосфата в глицерофосфат.

Как известно, внутренняя мембрана митохондрий плотная, среднее расстояние между белковыми комплексами составляет всего несколько нанометров, в результате чего могут происходить межбелковые взаимодействия. Последующие изучения митохондриальной

глицерофосфатдегидрогеназы показали, что этот фермент образует агрегаты с более высокой молекулярной массой, скорее всего, из-за его высокой гидрофобности. Т. Mracek (2014) с коллегами используя нативные электрофоретические системы, продемонстрировал, что фермент ассоциируется как с гомолигомерами, так и с высокомолекулярными суперкомплексами, которые представляют нативные формы митохондриальной глицерофосфатдегидрогеназы в мембране *in vivo* и способны продуцировать активные формы кислорода.

Метаболические и энергетические потребности специфичны для отдельных тканей [G. Benard, 2006]. Окислительное фосфорилирование регулируется с помощью обобщенных факторов транскрипции, таких как NRF1, NRF2 и YY1. [C. van Waveren, 2008]. Митохондриальная глицерофосфатдегидрогеназа изменяет свой уровень экспрессии в тканях, ее содержание и активность значительно отличается от других белков окислительного фосфорилирования. Самый высокий уровень был найден в бурой жировой ткани, мышцах, мозге, а самый низкий в печени и сердце, несмотря на то, что сердце имеет аналогично высокий окислительный потенциал как бурая жировая ткань. Есть и другие ткани, в которых фермент играет важную роль, а именно: β -клетки поджелудочной железы, семенники, плацента, а также в различных гликолитических клетках, например, фибробластах [Т. Mracek, 2009].

Исследования метаболической функции митохондриальной глицерофосфатдегидрогеназы начались в 1936 году исследователем Green D.E. и его коллегами, которые отметили, что данный фермент присутствует в различных количествах во многих тканях млекопитающих [D.E. Green, 1936]. Впервые наибольшее содержание данного фермента было отмечено в бурой жировой ткани и летательных мышцах насекомых [K.I. Ohkawa, 1969], также была исследована роль фермента, отмечалась очень высокая активность митохондриальной глицерофосфатдегидрогеназы вместе с крайне низкой

активностью ЛДГ [E.C. Zebe, 1957]. V. Kubitsa (1957) также отметил, что во время интенсивной мышечной нагрузки отмечается преобладание глицерол-3-фосфата по сравнению с лактатом. Так, независимо друг от друга две группы исследователей предположили о существовании глицерофосфатного челночного механизма.

Сегодня известно, что глицерофосфатный челнок состоит из двух глицерол-3-фосфат дегидрогеназ, а именно: цитозольной ГФД, которая растворима и НАДН зависима (ЕС 1.1.1.8) и митохондриальной, мембранносвязанной, ФАД зависимой ГФД (ЕС 1.1.5.3). Главная метаболическая роль этого челнока – окисление НАДН, образующегося в цитоплазме, что позволяет поддерживать постоянный уровень АТФ без накопления лактата. Глицерофосфатный челнок занимает второе место после по малат-аспартатного механизма. Данная система также является тонким регулятором синтеза триглицеридов и фосфолипидов, поскольку митохондриальная глицерофосфатдегидрогеназа и глицерол-3-фосфат ацилтрансфераза конкурируют за единый субстрат, определяя приоритетное для клетки в данный момент времени направление метаболизма [T. Mracek et al., 2013].

Интересными являются данные о перспективе использования глицерофосфатного челнока в качестве мишени в терапии ожирения, в работе по исследованию мышей с фенотипом LOU/C и увеличенным содержанием митохондриальной глицерофосфатдегидрогеназы в печени, экспрессия которой связана с повышенным содержанием рецепторов TR α 1 [N.Taleux, 2009].

Имеются отдельные указания на врожденные нарушения при прогрессировании нейродегенеративных заболеваний в частности при понижении активности Q дегидрогеназы [S.I. Goodman, 2002]; НАДН-дегидрогеназы [F. Distelmaier, 2009], глутаровой ацидемии типа II для электроно-транспортного флавопротеина; сукцинатдегидрогеназы [J. Rutter,

2010]. Вместе с тем не было зафиксировано тяжелых заболеваний в случае мутации гена GPD2. Исследования по изучению нарушения функционирования глицерофосфатдегидрогеназы показывают патогенетические эффекты, которые ассоциированы с тканями, где активность митохондриальной глицерофосфатдегидрогеназы повышена, а именно: β -клетки поджелудочной железы, яички, головной мозг, плацента, кроме этого, нарушенный обмен фермента также может негативно влиять на метаболизм мышечной и жировой ткани, в том числе на весь организм в целом. Вместе с тем выключение гена GPD2 вызывает мягкие, тканеспецифичные изменения, не угрожающие жизни нарушения [R.A. DosSantos, 2003; A. Alfadda, 2004]. Это объясняется тем, что главная метаболическая роль митохондриальной глицерофосфатдегидрогеназы - окисление цитозольного НАДН, может быть заменена малат-аспаратным челноком. Однако, полное отсутствие как митохондриальной, так и цитоплазматической дегидрогеназ является летальным для организма. Такие животные имели гипогликемию, увеличенное содержание жирных кислот в плазме, у них развивалась кетонурия, и они умирали в течение нескольких дней, что доказывает тот факт, что митохондриальная и цитоплазматическая глицерофосфатдегидрогеназы могут заменять друг друга в обмене липидов, но полное их отсутствие критично для организма [L.J. Brown, 2002].

Имеются сведения, что поврежденная функция митохондриальной глицерофосфатдегидрогеназы головного мозга, ассоциированная с нарушением гена GPD2 из-за транслокации в хромосоме у самок, выражалась в мягкой бессимптомной задержке умственного развития. Двукратное снижение экспрессии этого гена и снижение активности фермента в лимфобластной клеточной линии указывает ассоциирование функционального дефекта с задержкой умственного развития [H.Daoud, 2009].

Является важным участие митохондриальной глицерофосфатдегидрогеназы в патогенезе полигенных заболеваний, таких как инсулин независимого сахарного диабета. В многочисленных исследованиях была показана роль митохондриальной глицерофосфатдегидрогеназы и глицерофосфатного челнока в процессах, которые предшествуют выбросу инсулина в ответ на увеличенную концентрацию глюкозы. Метаболические нужды β -клеток поджелудочной железы покрываются за счет аэробного гликолиза. Эти клетки имеют низкую активность лактатдегидрогеназы и цитозольный НАДН, образовавшихся в ходе гликолиза и окисляются с использованием глицерофосфатного и малат-аспартатного челнока [M. Gudayol, 2002].

Роль глицерофосфатного челнока также важна при недостаточности цитрина. Цитрин – печеночный переносчик аспартата и глутамата, участвует в обмене мочевины, белков и биосинтезе нуклеотидов, доставляя аспартат из митохондрии в цитозоль, также участвует в переносе цитозольных эквивалентов НАДН в митохондрию как компонент малат-аспартатного челнока. Показано, что мутации в гене SLC25A13 вызывают недостаточность цитрина, проявляющуюся в виде цитрулинемии и неонатального внутрипеченочного холестаза. Мыши, нокаутированные по цитрину, не показывали проявлений патологии, но при нокауте как цитрина, так и гена GPD2 демонстрировали нарушение переноса транспорта НАДН из цитозоля в митохондрию без участия цитрина [T. Saheki, 2007]. Дальнейшее изучение этого вопроса выявило увеличение содержания глицерол-3-фосфата в печени, снижение интермедиатов цикла трикарбоновых кислот и нарушение обмена аминокислот, также влияя на цикл мочевины и катаболизм лизина [T. Saheki, 2011].

В ряде исследований было показано, что глицерофосфатдегидрогеназа может применяться как потенциальная цель для разработки лекарственного

средства против заболеваний, связанных с трипаносомами [S.Marche, 2000], лейшманиями [W.Maret, 2001].

Важная биологическая роль митохондриальной глицерофосфатдегидрогеназы в процессе капацитации сперматозоида, вместе со специфической для яичка регуляцией протомера C в гене GPD2, что было отмечено в сперматозоидах крысы и хомяков вследствие уменьшения образования активных форм кислорода, что ведет к ослаблению процесса капацитации [J.M. Weitzel, 2003; V. Kota, 2009, 2010].

Также интересна роль митохондриальной глицерофосфатдегидрогеназы в обмене веществ в плаценте и раковых клетках. Окислительный стресс во время беременности, в частности гипоксия и реокисление во время первого триместра выражается в увеличении напряжения кислорода и увеличение экспрессии антиоксидантных ферментов. Плацентарные митохондрии содержат большое количество митохондриальной глицерофосфатдегидрогеназы, которая вносит вклад в окислительный стресс [L. Myatt, 2004; T. Honzik, 2006].

Также высокие уровни митохондриальной глицерофосфатдегидрогеназы также были обнаружены в быстро растущих, недифференцированных опухолях, тогда как в медленно растущих недифференцированных опухолях наблюдалось нормальное или сниженное количество. Большинство злокачественных клеток имеют высокую скорость гликолитических процессов и образуют высокие уровни активных форм кислорода в сравнении с нормальными клетками. Следовательно, возрастает активность и содержание глицерофосфат-зависимой продукции активных форм кислорода и увеличение антиоксидантных ферментов. Представленные данные демонстрируют ведущую роль митохондриальной глицерофосфатдегидрогеназы в поддержании гликолиза и утечки электронов, которая ведет к запуску процессов перикисного окисления [S.K.Chowdhury, 2005, 2007].

Было показано, что митохондриальная глицерофосфатдегидрогеназа ускоряет окисление глюкозы, стимулируя выработку ацетил-кофермента А, ацетилирование гистонов и индукцию генов, кодирующих медиаторы воспаления в макрофагах, активированных бактериальным липополисахаридом [P.K. Langston et al., 2019]. Кроме того, связанные с опухолью макрофаги M2 продуцируют интерлейкин 1 β , который активирует фосфорилирование гликолитического фермента глицерофосфатдегидрогеназы, что способствует активации гликолиза и онкогенезу в клетках глиомы [J. Lu et al., 2020]. Исследование глицерофосфатдегидрогеназы представляет собой терапевтическую цель для лечения онкологических заболеваний и дает новое представление о механизмах, регуляции рака молочной железы [C. Zhou et al., 2017], головного мозга [P.Rusu et al., 2019], печени [F. Lorenzetti et al., 2020].

Таким образом, глицерофосфат и дигидроксиацетонфосфат представляют собой ключевые метаболиты, играющие важную роль в метаболизме углеводов и липидов, доступность этих молекул может регулировать энергетический и промежуточный обмен веществ, клеточный окислительно-восстановительный потенциал и выработку АТФ, определяя приоритетное для клетки в данный момент времени направление метаболизма. Многочисленные функции окислительно-восстановительных партнеров обеспечиваются тонкой регуляцией с помощью глицерофосфатдегидрогеназного челнока и его ферментов. Важной является роль митохондриальной глицерофосфатдегидрогеназы в метаболизме сахарного диабета, плаценты и раковых клеток, представляет собой потенциальную терапевтическую цель для разработки лекарственных средств, а также дает новое представление о механизмах и регуляции онкологических заболеваний.

1.3. Пируват – центральное звено метаболизма

Одним из важнейших промежуточных компонентов метаболизма и источником энергии для митохондрий является пируват. Как известно, пируват, являясь конечным продуктом гликолиза, направляется в митохондрии и полностью окисляется с образованием АТФ через цикл трикарбоновых кислот и окислительное фосфорилирование.

Пируват превращается в лактат, который выделяется в кровообращение и используется гепатоцитами для производства глюкозы посредством глюконеогенеза. Пируватдегидрогеназа фосфорилируется и инактивируется пируватдегидрогеназ-киназами, которые имеют четыре изоформы, а также дефосфорилируется и активируется пируватдегидрогеназфосфатазой. Уровни пируватдегидрогеназ-киназ 2 и 4 выше в голодном состоянии и при диабете [J.Y. Jeong et al., 2012]. Удаление пируватдегидрогеназ-киназы 4 (PDK4) увеличивает активность пируватдегидрогеназы, что позволяет направлять пируват в цикл трикарбоновых кислот для полного окисления. В результате, пируват не доступен для глюконеогенеза, что приводит к гипогликемии у мышей с нокаутом по PDK4 [N.H. Jeoung et al., 2006].

Альтернативно, гликолитические продукты используются для синтеза жирных кислот посредством липогенеза *de novo*. Инсулин активирует превращения пирувата в ацетил-КоА, который в дальнейшем может быть использован не только для выработки метаболической энергии, но и для биосинтеза липидов, кетоновых тел, биогенных аминов и ацетилхолина. Определенная доля ацетил-КоА в клетках тонкой кишки, печени, кожи и других органов направляется на биосинтез холестерина [Ю.А. Лысиков, 2013]. С другой стороны, жирные кислоты, высвобождаемые при липолизе, доставляются в печень и метаболизируются до ацетил-КоА, который усиливает активность пируваткарбоксилазы, направляя пируват в глюконеогенный путь [L. Rui, 2014; R.J. Perry et al., 2015]. Таким образом,

пируват, основной гликолитический продукт, обеспечивает источник углерода для липогенеза и связывает гликолиз с липогенезом.

Также в пируват могут быть превращены серин, треонин, глицин, цистеин и триптофан. Пируват, наряду с субстратами цитратного цикла (цитратом, сукцинатом, малатом), лактатом, глицерином, аминокислотами (аланин, глютамин, серин) участвует в регуляции метаболизма глюкозы с помощью метаболического шунтирования [K.S. McCommis, B.N. Finck, 2015].

Как и большинство метаболитов, пируват пересекает внешнюю мембрану митохондрии, используя потенциал-зависимые анионные каналы, что давно известно литературе [L.A. Lee et al., 1997]. Однако, оставалось вопросом, посредством чего пируват пересекает внутреннюю мембрану митохондрии. Предполагалось наличие некоторого белка-переносчика, который называли митохондриальный переносчик пирувата, хотя его структурные особенности долгое время оставались неясными.

В 2012 году двумя независимыми исследовательскими группами с помощью применения биоинформационных и генетических методов был открыт комплекс белков, отвечающий за транспорт пирувата через митохондриальную мембрану, который получил название митохондриальный переносчик пирувата (MPC) [D.K. Bricker et al., 2012; S.Herzig et al., 2012]. Данный комплекс состоит из трех типов белков, два из которых, MPC-1 и MPC-2, весом 12 и 15 кДа соответственно, встречаются почти во всех живых организмах, в том числе и у растений. Эти белки формируют олигомерный комплекс на внутренней мембране митохондрий весом порядка 150 кДа. Считалось необходимым присутствие и взаимодействие двух белков между собой для переноса пирувата через внутреннюю мембрану митохондрии. Однако, в 2018 году опубликовали исследование, показывающее MPC-2 как автономный транспортный белок, способный осуществлять перенос пирувата изолированно от белка MPC-1, в то время как MPC-1 не отличается такой

возможностью. Было отмечено, что ткани организма не однородны по экспрессии белков семейства MPC [R.S. Nagampalli et al., 2013]. Показано наличие сходства в строении семейства белков MPC с семейством простейших спиральных моно- и дисахаридных переносчиков SWEET и semiSWEET, которые функционировали еще в архейскую эру, что вносит новые элементы в представление о транспортных механизмах клетки [Y. Xu et al., 2014].

В экспериментах на мышах было установлено, что выключение гена, кодирующего белок-переносчик MPC-1, приводит к внутриутробной гибели потомства [B. Vanedrperre et al., 2014]. Недавние исследования показали, что РНК-интерференция белков MPC-1 и MPC-2, содержащихся в клетках млекопитающих, способна приводить к угнетению синтеза ацетил-СоА и встраивания интермедиатов в цикл трикарбоновых кислот, в подобной ситуации клетки были способны обеспечивать свой метаболизм посредством возросшего окисления глутамата митохондриями [G. Marino et al., 2014].

Пируват, в особенности его митохондриальная фракция, имеет большое значение для обменных процессов поджелудочной железы, в частности, секреции инсулина. Известно, что β -клетки поджелудочной железы имеют рецепторы к белкам и MPC-1, и MPC-2. Блокирование данных рецепторов специфическим ингибитором пирувата α -циано-4-гидроксициннаматом [A.P. Halestrap, 2012] приводит к уменьшению потребления кислорода, а также уменьшению соотношения АТФ/АДФ и НАДФН/НАДФ, что приводит к нарушению выделения инсулина, а также вызывает сбои в работе потенциал-зависимых калиевых ионных каналов [J.N. Patterson et al., 2014; P.A. Vigueira et al., 2017].

В ряде исследований исследовалась прогностическая роль митохондриального пируватного носителя при онкологических заблелваниях, в частности экспрессия MPC1 и MPC2 связана с благоприятными клиническими исходами при раке простаты [X. Li et al., 2016; M. Karsy et

al.,2018]. В том числе, был открыт новый сигнальный путь KDM5A / MPC-1, который способствует прогрессированию рака поджелудочной железы за счет перенаправления метаболизма митохондриального пирувата [J. Cui et al., 2020].

Одним из основных потребителей лактата при нормальных условиях является сердце. В кардиомиоцитах, у образовавшегося в процессе гликолиза пирувата есть несколько путей: превращение в лактат, декарбоксилирование в ацетил-КоА, карбоксилирование в малат или оксалоацетат. Декарбоксилирование — необратимый процесс, катализируемый пируватдегидрогеназой. Активация пируватдегидрогеназы напрямую зависит от концентрации Ca^{+2} и Mg^{+2} адренергического воздействия на миокард, а ингибирование — от концентрации свободных жирных кислот в плазме. Потребление пирувата растет при снижении окисления жирных кислот в цитозоле или при ингибировании этих процессов. Оборот жирных кислот и глюкозы в митохондриях объясняется циклом Рэндла, и, исходя из него, можно определить, что активность пируватдегидрогеназы детерминирована субстратом, потребление которого превалирует в данный момент [Д.А.Олейников, А.В. Яшин, 2015]. Окисление пирувата составляет от 10 до 30% метаболизма миокарда. В связи с этим, снижение уровня митохондриального метаболизма пирувата за счет увеличения экспрессии киназы пируватдегидрогеназы служит одним из звеньев патогенеза развития и ишемии сердечной мышцы [M.A. Schroeder et al., 2013].

В то же время, являясь α -кетокислотой, пируват способен проявлять цитопротективные свойства, сходные по эффективности воздействия с глутатионом, элиминируя молекулы пероксида водорода посредством деркабоксилирования и образования воды и углекислого газа. Показаны противовоспалительные эффекты пирувата в патогенезе модели сепсис-индуцированной острой почечной недостаточности, инфаркта миокарда, ишемического инсульта [M.G. Ryou et al., 2010], однако молекулярные

основы такого эффекта требуют дальнейшего изучения. Установлено, что пируват является критическим метаболитом в развитии острой почечной недостаточности любого генеза - данное патологическое состояние сопровождается падением уровня пирувата. Обсуждаются возможности терапии данного состояния внутривенным введением этого метаболита [A.C.M. Johnson, R.A. Zager, 2014].

Как было отмечено выше, пируват может образовываться в результате обмена многих аминокислот, однако особое внимание следует уделить аминокислоте, которая является одним из важнейших прекурсоров глюконеогенеза – аланине. Пируват, глутамат, аланин и α -кетоглутарат играют роль связующего звена между обменом углеводов и аминокислот, превращение данных интермедиатов возможно с помощью фермента аланинаминотрансферазы. Помимо каталитической активности, данный фермент служит маркером клеточного повреждения [I. Rafter et al., 2012].

Значимость пируваткиназы в процессах гликолиза, поддержания редокс-гомеостаза, пролиферации клеток обусловила научный интерес к этому ферменту. Установлено, что существуют четыре изоформы пируваткиназы: PKR (пируваткиназа эритроцитов), PKL (пируваткиназа печени) PKM-1 (данная изоформа встречается в здоровых зрелых клетках организма человека) и PKM-2 (изоформа, ассоциированная с клеточной пролиферацией). Интересно, что отличие в данных изоформах заключается лишь в 22 из 531 аминокислот, входящих в состав данного фермента [F.V. Filipp, 2013].

Аберрантный метаболизм пирувата был отмечен в клетках опухолей и назван эффектом Варбурга. Однако метаболический субстрат данного биохимического феномена долгое время оставался неустановленным. Проведенные исследования показали, что именно изоформа PKM-2 является маркером незрелости клеток и отвечает за развитие эффекта Варбурга [Z.Wang et al., 2012; M.Upadhay et al., 2013]. Фенилаланин служит

аллостерическим ингибитором пируваткиназы, а серин и аланин - аллостерическими активаторами [С. Kung et al., 2012]. Несмотря на то, что РКМ-2 относится к маркерам незрелых клеток, он встречается далеко не во всех типах опухолях. Например, исследование по изучение рака груди не выявило данной формы пируваткиназы [Y.H. Wanget al., 2013].

Представляет интерес способность РКМ-2 активировать генную экспрессию посредством связывания с HIF1a транскрипционным фактором, а также вызывать активацию макрофагов [E.M. Palsson-McDermott et al., 2015]. Активность РКМ-2 полностью ингибируется АДФ, что дает основание предполагать наличие множественных участков связывания фосфатных акцепторов, включая АДФ, а также некоторых гистонов (BUB3 Y207) и фосфоенолпирувата, который является донором фосфатной группы [X. Gao et al., 2012].

Плейотропность метаболических эффектов пирувата определяет его место в развитии различных дисметаболических заболеваний, обобщенные сведения о которых представлены в таблице 1.1, и делает его мишенью различных молекулярных и клинических исследований.

Малая молекула пируват важна не только в качестве молекулярного инструмента для исследования сложных биологических процессов, но и в качестве терапевтического средства для лечения заболеваний. Лактоацидоз типа А, вызванный гипоксической митохондриальной дисфункцией, является независимым предиктором смертности для критически больных пациентов. В патологических условиях, когда доставка кислорода ограничена, увеличивается выработка лактата, который вырабатывается в основном из скелетных мышц, кожи, мозга, кишечника и эритроцитов [B.Levy, 2006].

Таблица 1.1 – Ферментопатии, ассоциированные с нарушением обмена пирувата (R. Lawrence et al., 2014)

Фермент	Симптом недостаточности фермента	Исследования
Пируватдегидрогеназа	Нейродегенерация, лактацидоз, психомоторная задержка	A.Imbard et al., 2011 K.P. Patel et al., 2012
Лактатдегидрогеназа	Миоглобинурия, повышенное содержание пирувата, снижение толерантности к физическим нагрузками	T. Anai et al., 2002
Пируваткарбоксилаза	Лактацидоз, задержка развития, высокие уровни пролина и аланина	E. Ostergaard et al., 2013
Пируваткиназа	Гемолитическая анемия, гипербилирубинемия	A. Zanella et al., 2007
Аланинаминотрансфераза	Клинически невыраженные изменения	M.C. Sparkes et al., 1983
Митохондриальный переносчик пирувата (MPC)	Нейродегенерация, лактацидоз, психомоторная задержка	M.Brivet et al., 2003 D.K. Bricker et al., 2012
Фосфатаза пируватдегидрогеназы	Лактацидоз, повышенный уровень пирувата и аланина, низкая толерантность к физической нагрузке, гипотония	M.C. Maj et al., 2005 J.M. Cameron et al, 2009

Гипоксия часто вызывает повреждение органов, и глюконеогенез через цикл Кори может быть окончательно ингибирован из-за дисфункции печени и почек, что приводит к дальнейшему снижению клиренса лактата. Пируватдегидрогеназа является ключевым ферментом, который модулирует окисление глюкозы, превращая пируват в ацетил-КоА. Во время гипоксии активность пируватдегидрогеназы значительно ингибируется, и затем пируват превращается в лактат.

Пируват, является активатором и субстратом пируватдегидрогеназы, способен модулировать кислотный рН крови путем улучшения метаболических путей в условиях гипоксии и, таким образом, может быть оптимальным средством для коррекции лактатацидоза. Пируват имеет низкую константу диссоциации ($pK_a = 2,49$), что свидетельствует о его более слабой буферной способности по сравнению с лактатом ($pK_a = 3,9$). Следовательно, пируват может устранять лактатацидоз в основном благодаря своим биохимическим характеристикам в стимулировании энергетического обмена и улучшении митохондриальной энергетике для окисления, накопленного лактата и потребления избыточных протонов [Y. Wang et al., 2018].

Пируват находится в метаболическом центре, связывая гликолиз в цитозоле и окисление в митохондриях при метаболизме глюкозы. Экзогенный пируват может эффективно восстанавливать ингибированную активность пируватдегидрогеназы посредством снижения активности пируватдегидрогеназы-киназы [P.D. Mongan et al., 2003] и может усиливать анаэробный путь (пополнение субстратов цикла трикарбоновых кислот) путем улучшения пируваткарбоксилазы. Затем пируват окисляется до CO_2 и H_2O в цикле трикарбоновых кислот, который потребляет равный молярный протон. Следовательно, экзогенный пируват стимулирует поток цикла трикарбоновых кислот и ускоряет окисление лактата и потребление протона, повышая рН и продуцируя митохондриальную АТФ. Сообщается, что смещение равновесия пути лактатдегидрогеназы в направлении производства большего количества лактата приводит к потреблению протонов и увеличению соотношения $НАД^+/НАДН$ посредством гидрирования пирувата [A.P. Acharya et al., 2014]. Экзогенный пируват, как единственный субстрат, может самопроизвольно превращаться в лактат с помощью лактатдегидрогеназы, свободной от энергии. Реакция восстановления пирувата улучшает отношение $НАД^+/НАДН$, что важно для

поддержания гликолитического пути и генерации гликолитического АТФ в анаэробных условиях [S. Hu et al., 2013].

Пируват защищает функции многих органов при гипоксии, включая функции печени и почек, главных органов метаболизма глюконеогенеза. Таким образом, экзогенный пируват в качестве основного источника углерода может вступать и ускорять глюконеогенез, генерируя глюкозу и потребляя два протона [R.Liu et al., 2016]. Кроме того, улучшенная функция сердца, печени и почек в результате введения экзогенного пирувата способствует оксигенации тканей и клиренсу лактата.

Показано, что пируват стабилизирует индуцируемый гипоксией фактор-1 (HIF-1 α) в нормоксических условиях [C.L. Dalgard et al., 2004]. HIF-1 α является ключевым фактором транскрипции, который активирует ряд нижестоящих генов, участвующих в метаболизме глюкозы, способствуя экспрессии переносчиков и ферментов, связанных с метаболизмом глюкозы, таких как транспортеры глюкозы, гексокиназа, лактатдегидрогеназа-А и фосфоглицерат киназы 1. Повышенная регуляция этих белков может увеличить скорость аэробного гликолиза и увеличить окисление лактата и потребление протона. Кроме того, эритропоэтин, типичный повышающий регуляцию ген, индуцируемый HIF-1 α , выполняет цитопротекторные и противовоспалительные функции при различных патологических состояниях [S.Hu et al., 2016].

Пируват является природным поглотителем окислительного, нитрозативного стресса, напрямую реагирует со свободными кислородом и азотными радикалами, которые генерируются при гипоксии, неферментативным и стехиометрическим образом. Также, эта малая молекула оказывает свое антиоксидантное действие, косвенно увеличивая окислительно-восстановительные потенциалы, защищая функцию многих органов и, в частности, восстанавливая ингибированную активность пируватдегидрогеназы при гипоксии [P.Sharma et al., 2005].

Пируват защищает функцию эритроцитов, сохраняя анаэробные гликолитические пути. Например, консервирующая жидкость, содержащая раствор пирувата, может восстановить кислородосодержащую способность хранимых эритроцитов [S. Xia et al., 2016]. Пируват также защищает эритроциты, поддерживая уровни АТФ и ингибируя активированную активность eNOS и продукцию NO во время процедуры искусственного кровообращения *in vitro* [D. Gou et al., 2012].

Является интересным, что пируват служит основным питательным веществом для обеспечения процессов ремоделирования матрикса в культуре клеток рака молочной железы. Поглощение пирувата клетками индуцирует выработку α -кетоглутарата, что в свою очередь активирует гидроксирование коллагена за счет повышения активности фермента пролил-4-гидроксилазы [I. Elia et al., 2019].

В ряде работ было показано, что добавление пирувата индуцирует пролиферацию фибробластов посредством НАД⁺-зависимого синтеза аспартата в моделях остановки клеточного цикла, вызванных митохондриальной дисфункцией, и защищает фибробласты легких от старения путем увеличения соотношения НАД⁺/НАДН [K. Birsoy et al., 2015; L.V. Sullivan et al., 2015; C.D. Wiley et al., 2016].

Также была выявлена роль пирувата в дермальных фибробластах человека в нормальных условиях с добавлением и без раствора пирувата. Функциональным следствием лишения пирувата в культуральных средах было значительное снижение пролиферации фибробластов, а также активация процессов старения фибробластов вследствие увеличения активности β -галактозидазы, снижения уровня внутриклеточного белка группы высокой подвижности B1 [J.Y. Kim et al., 2018].

Была обнаружена протекторная роль пирувата в процессах старения кожи человека с использованием модели кожного эквивалента, которая близко имитирует *in vivo* кожу человека, культивируемую в присутствии

или отсутствии пирувата в течение 7 дней после контакта с воздухом [S.E. Fligiel et al., 2003].

Таким образом, пируват является ключевым энергетическим метаболическим субстратом и активатором пируватдегидрогеназы с несколькими уникальными полезными биологическими свойствами, включая антиоксидантное и противовоспалительное действие и способность активировать сигнальный путь HIF-1 α – эритропоэтин. Экзогенный пируват в натриевой соли сохраняет метаболизм глюкозы и клеточную энергетику, превосходя эффекты анионов бикарбоната, лактата, ацетата и малата в жидкостях внутривенного введения при эффективной коррекции гипоксического лактатацидоза [Y.Wang et al., 2018]. Пируват применялся в предварительных клинических испытаниях посредством системного введения больших доз и было показано, что он эффективен и имеет мало побочных эффектов [W. Schillinger et al., 2011].

1.4. Лактат – не тупик метаболизма

Лактат долгое время находился в центре противоречий. С момента своего открытия в 1780 году немецкоязычным шведским аптекарем и химиком Карлом Вильгельмом Шееле молочной кислоты в кислом молоке лактат часто ошибочно рассматривали как гипоксический тупиковый метаболит с множественными вредными эффектами. Только в 1980-х годах, с введением клеточного лактатного челнока, произошел сдвиг парадигмы понимания роли лактата в метаболизме. Доказательства того, что лактат в качестве основного игрока в координации метаболизма всего организма с тех пор быстро растет. Лактат - это легко сгораемое топливо, которое перемещается по всему телу, и это мощный сигнал для ангиогенеза независимо от напряжения кислорода. Многие фундаментальные открытия о лактате еще ждут своего открытия в научных исследованиях и клинической практике [M.J. Rogatzki et al., 2015].

Лактат (2-гидроксипропаноат), как известно, представляет собой гидроксикарбоновую кислоту, которая может существовать в организме человека в виде двух стереоизомеров, L-лактата и D-лактата, причем первый является преобладающим физиологическим энантиомером [J.P. Talasniemi et al., 2008].

В пределах физиологического диапазона pH мышц и крови молочная кислота более чем на 99% диссоциирует на анионы лактата и протоны водорода. Энантиомеры представляют собой пару стереоизомеров, которые являются зеркальным отображением друг друга. В случае La- углерод C2 является асимметричным, что приводит к энантиомерам, которые иногда обозначаются как L(+)-лактат и D(-)-лактат, хотя, возможно, более правильно как (S)-лактат и (R)-лактат соответственно [C.M. Chen et al., 2015]. В то время как в тканях и крови человека присутствует некоторое количество D(-) лактата как из эндогенных, так и из экзогенных источников, форма L(+)-лактат на сегодняшний день является наиболее преобладающей и образуется в результате гликолитической активности. Концентрация D(-) лактата в сыворотке у здоровых людей составляет от 0,013 до 0,2 мМ по сравнению с концентрацией L(+)-лактат порядка 1,0 мМ в покое и более 15,0 мМ после кратковременного упражнения с максимальным усилием [A.I. Filiz et al., 2010].

L-лактат либо продуцируется, либо удаляется с помощью обратимой окислительно-восстановительной реакции, катализируемой ферментом L-лактатдегидрогеназой, которая преимущественно находится в цитозоле клеток человека. В одном направлении реакции пируват восстанавливается с образованием L-лактата, тогда как восстановленный никотинамид-адениндинуклеотид (НАДН) окисляется до никотинамид-адениндинуклеотида (НАД+). Эта реакция термодинамически благоприятна. В противоположном направлении L-лактат окисляется с образованием пирувата, тогда как НАД+ восстанавливается до НАДН. У людей основными

источниками внутриклеточного L-лактата являются глюкоза и аланин благодаря их превращению в пируват. Было установлено, что в состоянии после абсорбции примерно 65% L-лактата в плазме происходит из глюкозы, в то время как 16-20% L-лактата в плазме происходит из аланина. В меньшей степени пируват может образовываться в результате катаболизма других аминокислот, включая серин, треонин и цистеин [A. Le et al., 2010].

Как известно, окисление L-лактата в пируват с помощью лактатдегидрогеназы в цитозоле является первым шагом метаболического клиренса L-лактата. Механизмы переноса пирувата из цитозоля в митохондриальный матрикс недостаточно известны, но недавно были идентифицированы два белка, MPC1 и MPC2, как важные для транспорта пирувата внутри митохондриальной сети у человека [D.K. Bricker et al., 2012]. На пируват может воздействовать два фермента: комплекс пируватдегидрогеназы и пируваткарбоксилаза, которые направляются соответственно на окислительный путь для доставки АТФ или на путь глюконеогенеза для генерации эндогенной глюкозы. Чтобы следовать окислительному пути, комплекс пируватдегидрогеназы превращает пируват в ацетил-кофермент А, обеспечивая проникновение ацетата в цикл трикарбоновых кислот. Чтобы инициировать путь глюконеогенеза, фермент пируваткарбоксилаза катализирует превращение пирувата в оксалоацетат [Ю.А. Лыиков, 2013]. Поскольку метаболический клиренс L-лактата происходит посредством его окисления до пирувата, врожденное или приобретенное ухудшение этих двух метаболических путей может привести к накоплению L-лактата. L-лактат также может быть использован для синтеза эндогенной глюкозы посредством глюконеогенеза, причем этот путь является основным путем клиренса L-лактата. Врожденный или приобретенный дефицит ферментов глюконеогенеза пируваткарбоксилазы, фосфоенолпируваткарбоксикиназы, 1,6-бисфосфатазы, глюкозо-6-фосфатазы,

ухудшает удаление L-лактата и могут привести к его накоплению [A.Battezzati et al., 2004].

В свою очередь, физиологические источники D-лактата у людей включают диетическое потребление некоторых продуктов, таких как кисломолочные продукты, йогурт, патока, яблоки, помидоры, соленья, пиво и вина [L.Zhang et al., 2003] и образование D-лактата путем бактериальной ферментации непереваренных углеводов в желудочно-кишечном тракте. Кроме того, D-лактат эндогенно образуется из метилглиоксаля через глиоксалазную систему. Незначительные количества метилглиоксаля непрерывно производятся во время гликолиза. Некоторые растворы для перитонеального диализа и введение пропиленгликоля, лактата натрия, раствора лактата Рингера могут служить источником экзогенного D-лактата. Здоровые люди обладают замечательной способностью утилизировать экзогенный D-лактат преимущественно путем эффективного окисления в пируват, хотя небольшое количество D-лактата может подвергаться почечной экскреции. После инфузии DL-лактата наблюдается значительное и длительное увеличение соотношения кетоновых тел β -гидроксibuтират / ацетоацетат [J.P. Talasniemi et al., 2008; J. Lu et al., 2011].

С появлением свидетельств того, что гипоксия не была основной причиной выработки лактата и что лактат мог фактически использоваться в качестве энергетического вещества многими тканями, произошел сдвиг парадигмы в концептуализации лактата в обмене веществ во время тренировки [G.A.Brooks, L.B.Gladden, 2003; D.G. Allen et al., 2008]. Brooks G.A. начиная с 1985 года ввел понятие лактатный челнок, теперь известный как межклеточный лактатный челнок. [G.A.Brooks, 1985]. Ключевая поддержка межклеточного лактатного челнока была получена из множества исследований изотопных индикаторов, проведенных лабораторией Брукса, которая отслеживала поток промежуточных углеродных соединений во время отдыха, физических упражнений и восстановления в сочетании с

артериовенозными измерениями обмена лактата [G.A.Brooks, 2000, 2002, 2009, 2012, 2016; B.C. Bergman et al., 2000].

В отличие от мнений, которые существовали в 19-м и начале 20-го века, которые рассматривали лактат как тупиковый, вызывающий «усталость» «ненужный продукт», в настоящее время подчеркивает лактат как энергетический промежуточный метаболит, который может образовываться в тканях, подвергающихся ускоренному гликолизу, и затем распространяться по всему организму для поглощения в качестве энергетического субстрата или в качестве предшественника для глюконеогенеза или гликогенеза. Метаболизм лактата происходит во всех тканях, в том числе в мозге [G.A.Brooks, 2007]. Лактат диффундирует из астроцита в соседний нейрон посредством монокарбоксидатных транспортеров. В нейроне лактат может окисляться в митохондриях, чтобы повторно синтезировать АТФ или используется для катаплеротического производства аминокислотных нейротрансмиттеров: глутамат, аспартат и ГАМК [G.A.Brooks, 2002; L. Pellerin et al., 2003].

Лактата в крови находится в концентрации 0,5-2,2 ммоль/л, после физической нагрузки содержание этого соединения повышается до 20-25 ммоль/л [P.G. Rosenstein et al., 2018]. Значение лактата как источника топлива для сердечной мышцы проявляется в случае β -адренергической стимуляции, повышенной постнагрузки, хронотропной проблемы и шока [G.D. Lopaschuk et al., 2010].

В настоящее время большое количество исследований посвящено трансмембранному движению лактата. Выяснено, что в целом это осуществляется белками семейства растворенных белков 16 типа (Solute Carrier Family 16 (SLC16), одним из 52 семейств SLC с более чем 300 участниками [R.S. Jones, M.E. Morris, 2016]. Монокарбоксидатные транспортеры представляют собой семейство переносчиков, включающее 14 родственных белков, четыре из которых особенно важны для транспорта

лактата, пирувата и кетоновых тел [A.P. Halestrap, 2012, 2013]. Скорость обмена лактата резко повышается благодаря увеличению активности монокарбоксилатных транспортеров и не зависят от энергии, способствуя снижению градиента концентрации метаболита в сочетании с ионами водорода. Как отмечают Halestrap A.P. и Wilson M.C. (2012), основные различия между монокарбоксилатными транспортерами 1–4 классов заключаются в их аффинности к субстрату и ингибитору, а также к тканям, в которых они экспрессируются. Для L-лактата МСТ1 является стереоселективным, K_m приблизительно равна 3-5 мМ, для d-лактата в десять раз выше. По сравнению с МСТ1 МСТ2 имеет более высокое сродство как к пирувату ($K_m = 0,1$ мМ), так и к лактату ($K_m = 0,74$ мМ). МСТ3 имеет сходные кинетические свойства с МСТ1; однако он ограничен базальной мембраной пигментного эпителия сетчатки и эпителия сосудистого сплетения. МСТ4 также широко экспрессируется в тканях и имеет более высокую экспрессию в тканях, связанных с чистым экспортом лактата, таких как быстрые гликолитические скелетные мышцы, астроциты, лейкоциты и хондроциты [A.P. Halestrap, D. Meredith, 2004]. Функциональное отличие МСТ4 от МСТ1 можно оценить по значениям K_m для пирувата и L-лактата около 150 и 28 мМ соответственно, что, по-видимому, способствует удержанию пирувата в клетках. и ограничивает потерю лактата до более высоких физиологических концентраций [A.P. Halestrap, M.C. Wilson, 2012].

Существует мнение, что транспортеры МСТ1 и МСТ4 при многих видах рака часто сверхэкспрессируются [K.M. Kennedy, M.W. Dewhirst, 2010; I. San-Millon et al., 2017], коррелирует с плохим прогнозом и высокой смертностью [N. Pertega-Gomes et al., 2011].

Цитозоль-митохондриальный лактатный челнок описывает непрерывное гликолитическое продуцирование и митохондриальное окисление лактата в клетке своего происхождения. В этой модели митохондрии окисляют лактат

на внутренней митохондриальной мембране или рядом с ней, вероятно, с помощью комплекса окисления лактата. [D.A. Kane, 2014; A. Schurr, 2017].

Существует мнение о том, что анион лактата во время клеточного стресса представляет собой сигнальную молекулу - «лактормон». Лактат служит энергетическим субстратом, ингибирует липолиз и пропорционально снижает окисление глюкозы. Лактат достигает этой латормоноподобной регуляции метаболизма, взаимодействуя с рецептором GPR81, связанным с G-белком на жировых клетках, что подтверждается уровнем экспрессии, которая намного выше в жировой ткани, чем экспрессия GPR81 в мозге, скелетных мышцах, сердце и других ткани [G.A. Brooks, 2009; C. Liu et al., 2009; K.H. Lauritzen et al., 2014; I.San-Millon et al., 2017].

Неисключено более длительное влияние на экспрессию генов через индуцируемый гипоксией фактор-1 (HIF-1), транскрипционный фактор, рассматриваемый как главный регулятор гомеостаза кислорода [G.L. Semenza, 2004]. Активируемый пролифератором пероксисом рецептор гамма-коактиватор-1 α (PGC-1 α), транскрипционный коактиватор, широко рассматриваемый как главный регулятор митохондриального биогенеза, также играет роль в регуляции метаболизма лактата [X. Liang et al., 2016]. Существует также доказательство роли лактата в регуляции объема жидкости во время тяжелых упражнений. Во время умеренно-интенсивных упражнений гипотоническая жидкость вытесняется из сосудистого компартмента, вызывая увеличение осмолярности плазмы [G.W. Mack, 2012].

Интересным является роль лактата в качестве нейропротекторного фактора. Механизм действия интермедиата связан с белком MTRNR2, который уменьшает продукцию бета-амилоидного пептида при болезни Альцгеймера [M. Zhang et al., 2018], теперь лактат рассматривается как своего рода медиатор или даже гормон, участвующий в таких сложных процессах, как формирование памяти и нейропротекция [P. Proia et al., 2016]. Лактилирование остатков лизина гистона, служит эпигенетической

модификацией, которая непосредственно стимулирует транскрипцию генов из хроматина макрофагов и способствует их гомеостазу, что представляет собой возможность улучшить понимание функций лактата и его роли в различных патофизиологических состояниях, включая инфекцию и рак [D. Zhang et al., 2019].

Как известно, лактатдегидрогеназа (Е.С. 1.1.1.27) катализирует реакцию восстановления пирувата в лактат, имеет молекулярную массу 140 кДа и представляет собой тетрамер, построенный из мономеров двух типов, отличающихся по физико-химическим и кинетическим свойствам. Фермент обладает высокой специфичностью, на каждую субъединицу приходится одна молекула связанного кофермента. При низкой концентрации лактатдегидрогеназы происходит диссоциация на субъединицы, которые не обладают каталитической активностью. Фермент содержит реакционноспособные сульфгидрильные группы, модификация которых приводит к потере активности, также ингибирующим действием обладают малонат, оксалат, избыток пирувата и НАД⁺ [Северин С.Е., Соловьева Г.А., 1989].

По литературным данным, лактатдегидрогеназа играет важную функцию в активном метаболизме, в том числе ключевую роль в клинической диагностике различных распространенных и редких заболеваний, является важным диагностическим биомаркером и противоопухолевой мишенью [А.А.Khan et al., 2019]. Рак является метаболическим заболеванием, при котором аномально пролиферирующие раковые клетки перестраивают метаболические пути в микроокружении опухоли. Молекулярное перепрограммирование опухолевого микроокружения помогают раковым клеткам удовлетворять повышенные метаболические потребности в биоэнергетике и клеточном биосинтезе благодаря регулированию экспрессии метаболических ферментов. Гликолиз увеличивается в большинстве злокачественных клеток, обеспечивая наибольшую долю энергии,

необходимой для пролиферации клеток. В свою очередь, лактатдегидрогеназа играет важную роль в регулировании обмена питательными веществами между опухолью и стромой. Изофермент ЛДГ-К, экспрессируемый в основном злокачественными клетками, значительно увеличивает образование лактата. Лактат вызывает пролиферацию оксигенированных злокачественных клеток, ангиогенез и ингибирует врожденные и адаптивные иммунные ответы. В свою очередь, исходное повышение лактатдегидрогеназы в сыворотке коррелирует с более короткой выживаемостью [D. Deme et al., 2017; S. Mansouri et al., 2017; M.D. Banerjee et al., 2019].

Таким образом, лактат, образующийся благодаря действию лактатдегидрогеназы, является не тупиком метаболизма, а энергетическим промежуточным метаболитом, который может образовываться в тканях, подвергающихся ускоренному гликолизу, распространяясь по всему организму для поглощения в качестве энергетического субстрата для мозга и сердечной мышцы или в качестве предшественника для глюконеогенеза или гликогенеза, регулируя гомеостаз и метаболизм, являясь сигнальной молекулой.

1.5. Оксалоацетат и малат - компоненты малат-аспартатного шунта

Оксалоацетат представляет собой молекулу из четырех атомов углерода с молекулярной массой 130, является переключателем обменов белков, углеводов, участвует в метаболических путях, включая глюконеогенез, цикл лимонной кислоты, глиоксилата, мочевины и метаболизм аминокислот. Как известно, в циклах глиоксилата и лимонной кислоты оксалоацетат образуется в результате катализа малатдегидрогеназы. Являясь критическим компонентом в производстве АТФ, оксалоацетат должен постоянно регенерироваться, чтобы цикл лимонной кислоты и цепь переноса электронов продолжались [F. Campos, 2012].

В цикле мочевины и в метаболизме аминокислот аспарат трансаминируется с образованием оксалоацетата, реакции, катализируемой глутамат-оксалоацетаттрансаминазы. Глутамат-оксалоацетаттрансаминаза, также называемая аспараттрансаминазой, представляет собой пиридоксальфосфат-зависимый фермент, который катализирует обратимый перенос α -аминогруппы между аспаратом и глутаматом, превращая глутамат в α -кетоглутарат и оксалоацетат в аспарат. Другими ферментами, которые действуют на оксалоацетат, являются пируваткарбоксилаза, фосфоенолпируваткарбоксикиназа, оба участвуют в глюконеогенезе [R. Pesì Et al., 2018].

Оксалоацетату свойственно явление таутомерии, представляет собой ценную и достаточно редкую молекулу, ее концентрация в митохондриях не превышает 10^{-6} М [D.L. Nelson et al., 2013]. Одна из первых работ, нацеленных на изучение оксалоацетата, датирована 1935 годом, когда работающий над исследованием пропионовокислых бактерий для своей диссертации Н.Г. Вуд установил, что при ферментативных процессах число атомов углерода в молекуле не уменьшается, а увеличивается, следовательно, происходит фиксация углекислого газа из буферного раствора. Ученый предположил, что в основе этого процесса лежит реакция: $\text{CO}_2 + \text{пируват} \rightarrow \text{оксалоацетат}$. Позднее, были получены экспериментальные подтверждения, а лежащий в основе процесс получил название реакции Вуд-Веркман [Н.Г. Вуд, С.Н. Веркман, 1935].

Дальнейшее изучение этого вопроса показало, что фиксация углекислого газа в оксалоацетат может происходить различными путями: в результате реакции Вуд-Веркман; под действием декарбоксилирующей малатдегидрогеназы; под действием фосфоенолпируваткарбоксикиназы, а также под действием фосфоенолпируваткарбоксилазы [М. Mazelis, В. Vennesland, 1957].

По мере того как исследователи овладели методом меченых радиоизотопов, стала возможна оценка пути меченого атома углерода оксалоацетата и его местоположение в последующих метаболитах цикла трикарбоновых кислот. Данная работа разрешила длительно продолжающуюся дискуссию о том, образуется ли цитрат, изоцитрат, или цис-аконитат как первый метаболит цикла Кребса, установив образование цитрата, тем самым отдав приоритет теории А. Огстона о прохиральности этой молекулы [A.G. Ogston, 1948]. На сегодняшний день известно, что путем конденсации оксалоацетата и ацетил-КоА под действием фермента цитратсинтазы образуется цитрат. Кроме того, благодаря методам рентгенструктурного анализа получены исчерпывающие данные о структуре данного фермента [D.M. Ferraris et al., 2015]. Каждая субъединица цитратсинтазы состоит из двух доменов, один из которых отличается большими размерами и крайне жесткой структурой, другой – меньшего размера и обладает большой эластичностью. Активный центр фермента располагается между двумя доменами. Оксалоацетат присоединяется первым к малому домену, вызывая значительные конформационные изменения, после чего присоединяется молекула ацетил СоА, вновь вызывая конформационную перестройку, в ходе которой высвобождается СоА-SH и образуется цитрат. Теоретически одной молекулы этого метаболита может быть достаточно для нормального функционирования цикла Кребса, который сопровождается затратой и восстановлением одной молекулы оксалоацетата. Помимо этого, через анаплеротические реакции, в результате которых происходит синтез оксалоацетата из фосфоенолпирувата и пирувата, происходит восполнение недостающих метаболитов в цикле трикарбоновых кислот [E. Kanamori et al., 2015].

Оксалоацетат оказывает ингибирующее воздействие на сукцинатдегидрогеназу, которая является не только участником цикла Кребса, но и важным элементом в цепи переноса электронов. Установлено,

что нарушение функции сукцинатдегидрогеназы сопровождается рядом патологических состояний, таких как синдром Ли [J. Finister, 2008], нейроэндокринные опухоли [R. Armstrong et al., 2009], синдром семейной параганглиомы [Y.F. Her, L.J. Masher, 2015]. Известно, что среди ингибиторов данного фермента выделяют два класса: убихиноловые (карбоксин, теноилтрифторацетон) и ингибиторы-аналоги сукцината (малонат, малат, оксалоацетат). Причина, по которой оксалоацетат проявляет столь выраженное ингибирующее влияние на сукцинатдегидрогеназу, долгое время оставалось неясной. Одна из гипотез сводится к тому, что оксалоацетат обладает протективным действием, предупреждая обратный ток электронов, который в противном случае смог бы вызвать увеличенное высвобождение супероксида [F.L. Muller et al., 2008]. Говоря об активности в отношении свободно-радикальных процессов, необходимо отметить, что малат также является клеточным протектором. Он способен увеличивать активность таких ферментных комплексов, как супероксиддисмутаза и глутатионпероксидаза, вероятно, за счет усиления экспрессии матричной РНК [F. Qiang, 2015].

Оксалоацетат, превращаясь в малат, высвобождает окисленный переносчик НАД⁺, и моделирует активность гликолитического расщепления глюкозы в сторону усиления данного процесса, а также увеличивает массу митохондрий, симулируя сценарий ограничения поступления калорий в организм [H. Yang et al., 2007]. Лактат и пируват в определенной степени также способны моделировать энергетический статус клетки, но значительное увеличение их концентрации приводит к снижению эффективности гликолиза по механизму обратной отрицательной связи, поскольку они являются конечными продуктами этого метаболического пути [R.H. Swerdlow, 2016].

Помимо прочего, оксалоацетат является участником глиоксилатного цикла - анаболического пути, сходного с циклом трикарбоновых кислот,

присущего растениям, протеем и дрожжам. В ходе данного цикла происходит превращение уксусной кислоты в ди- и трикарбоновые кислоты, а промежуточным продуктом является глиоксидовая кислота. Имеются данные о функционировании данного пути и в клетках печени человека [G. Springsteen et al., 2018].

Продолжая перечислять внутриклеточные функции оксалоацетата, важно отразить участие данного интермедиата в процессах глюконеогенеза и глицерогенеза, более того, под действием фермента фосфоенолпируваткарбоксикиназы оксалоацетат способен увеличивать объем митохондрий в поперечнополосатой мускулатуре, что положительно сказывается на выносливости и уменьшает мышечное утомление [P. Nakimi et al., 2007].

Оксалоацетат важен не только в качестве молекулярного переключателя и посредника в сложных биологических процессах, но и в качестве терапевтического биоэнергетического средства. Литературе известен пример антидиабетического эффекта действия оксалоацетата, полученного из растения *Eunymus alata sieb*, а также ex tempore полученных солей оксалоацетата. Пероральный прием солей оксалоацетата достоверно снижал уровень кетоновых тел и повышал уровень глюкозы в крови, что связано с тем, что в присутствии оксалоацетата молекула ацетил-КоА участвует в образовании цитрата и успешно входит в цикл Кребса. При отсутствии субстрата для протекания данной реакции две молекулы ацетил-КоА образуют молекулу ацетоацетата, вступая на путь кетогенеза [F. Campos et al., 2011].

По литературным данным известно, что оксалоацетат способен препятствовать нейровоспалению, нейродегенерации и уменьшать содержание глутамата в головном мозге, в результате активации резидентного в крови фермента глутамат-оксалоацетаттрансаминазы, который катализирует обратимое превращение оксалоацетата и глутамата в

аспартат и α -кетоглутарат. Нейропротекторное действие оксалоацетата обусловило проведение доклинических испытаний препаратов против болезни Альцгеймера и как первой линии терапии при ишемическом инсульте головного мозга [H.A. Yamamoto et al., 2003; D. Nagy et al., 2009; V.I. Teichberg et al., 2009; F. Campos et al., 2011; 2012; R.H. Swerdlow et al., 2016; H.M. Wilkins et al., 2016].

Кроме того, оксалоацетат стимулирует рост нейронов гиппокампальной извилины, что сопровождается снижением интенсивности деления клеток. Поддержание активного деления клеток данной области благоприятно сказывается на когнитивных процессах и мнемонистических функциях. Эти эксперименты проведены на лабораторных крысах, отмечено, что интермедиат влияет на ряд важнейших функций: оказывает общий промитохондриальный эффект, увеличивая содержание митохондриальных маркеров COX411 и PGC1 α ; усиливает сигнальный путь инсулина путем фосфорилирования участков Akt Ser473, mTOR Ser2448 и P70S6K Thr389; снижает концентрацию цитокина воспалительного ответа CCL11 [H.M. Wilkins et al., 2014].

Малат - окислительно-восстановительный партнер оксалоацетата - четырехуглеродная двухосновная оксикарбоновая кислота - универсальная молекула, общая для абсолютного большинства организмов от бактерий архейской эпохи до млекопитающих. Это логичным образом объясняет тот факт, что данный интермедиат выполняет столь различные функции переключателя путей метаболизма: принимает участие в гликолизе, бета-окислении высших жирных кислот, синтезе аминокислот, играет важную роль в транспортном сообщении между митохондриями и цитозолем, оказывая анаплеротическое или катаплеротическое действие на цикл Кребса [P. Minarik et al., 2002; E. Easlon et al., 2008]. Кроме того, в растительных клетках малат участвует в окислении лигнина, фотосинтезе, фиксации азота

клубеньковыми бактериями, а также облегчает поглощение фосфора и железа из внешней среды [J. Schulze et al., 2002].

Малат и оксалоацетат способны влиять на продолжительность жизни, активируя транскрипционные факторы FOXO / DAF-16 и протеин-киназы, активируемые аденозинмонофосфатом [D.S. Williams et al., 2009; C.B. Edwards et al., 2013]. Известно, что малат может опосредованно оказывать антигипоксический эффект, предварительно дегидратируясь до фумарата, что приводило к незначительному разобщению дыхания и окислительного фосфорилирования [О.А. Сафонова с соавт., 2004]. Сообщалось также, что оксалоацетат обеспечивает антиоксидантную защиту для клеток, таким как экситотоксическое повреждение [H.A. Yamamoto, P.V. Mohanan, 2003], перекись водорода, тиобарбитуровая кислота [R.L. Puntel et al., 2005].

Однако, при исследовании способности аминокислот влиять на продолжительность жизни было установлено, что аспарат, углеродным донором которого является оксалоацетат, не обладает такой способностью [C.B. Edwards et al., 2015]. Другой особенностью аспартата является то, что он играет важную роль в поддержании роста злокачественных клеток, так как перенаправляет биоэнергетический поток с циклов утилизации глюкозы на синтетические нужды опухоли [S. Cardaci et al., 2015]. С другой стороны, канонические функции аспартата крайне важны: без аспартата невозможен физиологический обмен нуклеотидов, так как, наравне с карбамоилфосфатом, он является прекурсором пиримидинового ядра, поставляя структурные элементы для N-1, C4-C6 [B.A. Moffatt, H. Ashihara, 2002].

Как известно, малатдегидрогеназа (EC 1.1.1.37) обратимо катализирует превращение оксалоацетата и малата с использованием коферментной системы НАД/ НАДН. Малатдегидрогеназы принадлежат к НАД-зависимым дегидрогеназам, которые являются одним из крупнейших и наиболее изученных семейств нуклеотидсвязывающих белков. Длина их

полипептидных цепей незначительно варьирует - около 350 остатков. Аминокислотные последовательности малатдегидрогеназы обнаружены в двух основных филогенетических группах близкородственных ферментов и имеют высокую идентичность аминокислотной последовательности с лактатдегидрогеназами, кроме того, используют один и тот же кофермент для каталитического окислительно-восстановительного взаимопревращения с помощью сходных механизмов. Связь между лактатдегидрогеназой и ЛДГ-подобной группой малатдегидрогеназ была подтверждена кристаллографическим исследованием. Экспериментально подтверждено, что в положении 86 остатки R и Q являются консенсусными для лактатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы, соответственно, и ответственны за специфичность связывания субстрата. Одна замена остатка в этом положении способна переключать специфичность фермента [S.V. Richard et al., 2000; G.X. Yu et al., 2005].

Общеизвестно что, дегидрогеназы представляют собой большие белковые молекулы, такие как лактатдегидрогеназы и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, которые являются гомотетрамерами, тогда как малатдегидрогеназы и печеночные алкогольдегидрогеназы являются димерами, что указывает на важную связь стабильности белка и их ферментативной активности. Каждая субъединица содержит две структурно и функционально разные области. НАД-связывающий домен, занимающий аминоконцевую половину каждой молекулы, содержит структуру с параллельными β -слоями. Основная динуклеотидсвязывающая структура состоит из четырех β -листов и одной α -спирали. Карбокси-концевой домен содержит сайт связывания субстрата и аминокислоты, необходимые для катализа [P. Minarik et al., 2002; D.M. Ferraris et al., 2015].

Интересными являются данные, что дегидрогеназы *Homo sapiens* глицерофосфатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, алкогольдегидрогеназа, изоцитратдегидрогеназа и другие имеют структурное

сходство между собой [L.S. Mydy et al., 2019]. Последовательности этих ферментов примерно на 20% имеют идентичное строение и содержат соответствующую складку Россмана для связывания кофактора. Кроме того, большинство из них обнаруживаются в открытых и закрытых конформациях, и можно обнаружить роль общего основания – лизина - в активном сайте [S. Kolappan et al. 2015, J.M Gonzalez et al., 2018].

У эукариот малатдегидрогеназа экспрессируется в виде митохондриальной и цитозольной изоформ. На сегодняшний день нет однозначной полной картины кинетики катализа этой реакции для какой-либо изоформы. Димер митохондриальной малатдегидрогеназы имеет молекулярную массу ~ 70 кДа, и может диссоциировать на мономер при низкой концентрации фермента и при низком pH (4,8). Этот фермент аллостерически регулируется цитратом, ингибируется 2-теноилтрифторацетоном, АТФ, АДФ, АМФ, фумаратом, цитратом и аспартатом и высокими концентрациями оксалоацетата, кроме того чувствителен к ионной силе [S.K. Dasika et al., 2015]. Цитозольные формы являются более полярными соединениями с ярко выраженными кислотными свойствами по сравнению с митохондриальными ферментами [R.A. Musrati et al., 1998].

Малат-аспартатная редокс система имеет два домена - митохондриальный и цитозольный – а также располагает двумя транспортерами: глутамат-аспартат и малат-альфакетоглутарат. В первом случае выход аспартата за пределы митохондрии сопровождается стехиометрическим входом глутамата и протонов, поэтому данная реакция является необратимой. В то время как обмен малата и α -кетоглутарата протекает по градиенту концентрации, поэтому может быть двунаправленным [D.I. Abbrescia et al., 2012].

Было показано, что в сердечной мышце активность челнока малат-аспартат более, чем в 10 раз превосходит все остальные известные системы

транспорта электронов. Исследование миокардиоцитов в период ишемии и в момент постишемической реперфузии показало колоссальную важность данной системы в адекватном обеспечении клеток энергией. В момент восстановления кровотока по коронарным артериям наблюдается диссоциация метаболитов челнока в митохондриях и цитозоле, что делает гликолиз единственным возможным путем получения энергии и сопровождается накоплением лактата [M. Lu et al., 2008]. Однако, введение аминоксиацетата в период, предшествующей ишемии, приводил к полному выключению работы челнока и не вызывал накопления лактата [N.R. Jespersen et al., 2017], хотя механизм такого ответа остается неопределенным.

Помимо отмеченного, малат-аспартатный механизм является звеном антиоксидантной защиты: наличие этой системы было необходимо для поддержания жизнедеятельности клеточной линии PC 12, а при уменьшении содержания малат-аспартатного челнока наблюдалось снижение концентрации глутатиона [C. Wang et al., 2014]. Синтез инсулина бета-клетками поджелудочной железы, нейротрансмиттеров также затруднен без участия малат-аспартатной системы [B. Pardo et al., 2013].

Изоформа, расположенная в глиоксисоме принимает участие в окислении липидов. Примечательно, что изоформы малатдегидрогеназы, участвующие в биосинтезе жирных кислот используют в качестве кофермента НАДФ/НАДФН. Однако, согласно современным данным вклад малатдегидрогеназы в липогенез составляет менее 40%, отдавая абсолютное первенство в 60% пентозофосфатному пути. Тем не менее, гиперэкспрессия НАДФН-зависимых малатдегидрогеназ приводит к усиленному липогенезу и, как следствие, ожирению, также такое метаболическое окружение благоприятно для опухолевых клеток [H. Kather et al., 2000].

Клинический интерес к данному ферменту обусловлен еще и тем, что он ассоциирован с неблагоприятным прогнозом при таких патологических состояниях как меланома кожи, мелкоклеточный рак легкого [J.G. Ren et al.,

2014], рак желудка [Y.X. Lu et al., 2018], аденокарцинома поджелудочной железы [M. New et al., 2019]. Было показано, что мутации в гене MDH2, кодирующие фермент цикла Кребса, вызывают тяжелую энцефалопатию и связаны с тяжелыми неврологическими клиническими проявлениями у детей. MDH2 был идентифицирован как новый ген восприимчивости к феохромоцитоме и параганглиоме [S. Ait-El-Mkadem et al., 2017]. Кроме того, определение митохондриальной малатдегидрогеназы в цереброспинальной жидкости является диагностическим маркером для дифференциальной диагностики нейродегенеративных заболеваний у пациентов с генетическими прионными заболеваниями, в частности со спорадической болезнью Крейтцфельда-Якоба [I.Zerr et al., 2019]. Была показана прогностическая значимость исследования показателей изоферментов биологического окисления лактатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы у детей с острым гематогенным остеомиелитом [С.Н. Гисак с соавт., 2008]. Было выявлено снижение активности НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы и работы пентозофосфатного пути в плаценте при беременности, осложненной обострением герпетической инфекции [И.В. Довжикова, М.Т. Луценко, 2009].

В литературе имеются сведения о участии малатдегидрогеназы в метаболизме рака. Малатдегидрогеназа служит источником НАД⁺ дополнительно к лактатдегидрогеназе. Увеличение активности малатдегидрогеназы в отсутствие лактатдегидрогеназы демонстрирует поддерживающую роль малатдегидрогеназы в гликолизе. Следовательно, снижение активности и экспрессии малатдегидрогеназы в прямой реакции может представлять собой молекулярную мишень для устранения ее потенциального влияния на метаболизм опухоли [S. Mansouri et al., 2017]. В том числе было показано, что малат-аспартатный челнок в раковых клетках способствует окислению лактата в митохондриях [O. Altinok et al., 2020].

Таким образом, оксалоацетат является «точкой пересечения» многих метаболических путей обмена белков, углеводов. Благодаря его центральной роли в энергетическом обмене, оксалоацетат был назван биоэнергетическим лекарственным препаратом, специально разработанным для повышения уровня энергии клеток. 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.

Приведенные выше данные, раскрывают многообразные эффекты промежуточных естественных интермедиатов глицерофосфата и дигидроксиацетонфосфата, пирувата и лактата, оксалоацетата и малата с различных точек зрения, играющих ключевую роль в метаболизме. Современная наука задается вопросом не только о том, как эти метаболиты интегрированы в метаболические системы такие как цикл трикарбоновых кислот и гликолиз, но и как они ведут себя, когда сами являются изолированной системой. Подходы биоэнергетической и митохондриальной медицины показывают возможность использования данных метаболитов как лекарственных средств, воздействующих на одну из самых начальных ступеней организации жизни, а значит, и увеличивающих эффективность воздействия.

1.6. Биоэнергетическая и митохондриальная медицина

Благодаря техническому прогрессу и развитию молекулярно-генетических методов диагностики большое развитие получила биоэнергетическая и как ответвление митохондриальная медицина, которая изучает основные биохимические циклы и пути поддержания энергетического статуса клетки, с целью управления биоэнергетическими

потоками, с перспективой обратить вспять патологические изменения, а также замедлить старение клеток [W. Wang et al., 2016; Л.П. Зубкова, В.А. Бочаров, 2017].

Биоэнергетика относится к химии и молекулярной физиологии энергетического обмена. Чаще всего она рассматривается на уровне отдельных клеток, причем биоэнергетический статус клетки обычно суммируется как количество выделяющих энергию промежуточных соединений, таких как АТФ, при этом баланс определяется между скоростью промежуточного производства и потребления энергии. Внутри клеток эти пути варьируют в виде протяженных компартментов, и характеризуются прохождением углерода, который начинается как часть одной молекулы и заканчивается как другая, что можно описать движением по пути или «потоком» [R.H Swerdlow., 2014].

Этиологически актуальным является изучение изменений в биоэнергетических процессах, так как они происходят при многих заболеваниях, в том числе при митохондриальных энцефаломиопатиях, нейродегенеративных заболеваниях и раке. Биоэнергетические изменения, вызванные этими патологиями, опосредуют или усиливают определенный фенотип или проявления заболевания. Имеются данные, что наблюдается митохондриальная дисфункция, при которых митохондрии, по-видимому, играют особенно ведущую роль - «митохондриопатии». При этом митохондриальная дисфункция имеет тенденцию вызывать биоэнергетические изменения или совпадать с ними [R.H.Swerdlow, 2009; M.G. Vander Heiden et al., 2009; R.K.Chaturvedi, M.F. Beal, 2013].

«Митохондриальная медицина» относится к науке корректировки последствий митохондриальных нарушений. Имеются сведения, что благодаря лавированию биоэнергетическими путями, которые лежат вне митохондрий можно косвенно управлять митохондриями, и как следствие смягчать воздействие митохондриальной недостаточности. Эта стратегия

влияет на немитохондриальные биоэнергетические параметры, в том числе на экспрессию генов, которые контролируют и реагируют на общее биоэнергетическое состояние клетки, а также могут существенно повлиять на здоровье и жизнеспособность клеток [R.H.Swerdlow, 2011; 2014; M.Picard, 2016; Е.М. Франциянц с соавт., 2020].

Как известно, гликолиз учитывает анаэробный синтез АТФ и происходит в цитозоле. В митохондриях превращение пирувата в ацетил-КоА с последующим полным оборотом цикла Кребса снижает НАД⁺ до НАДН и ФАД до ФАДН₂. Цитозольный НАДН, который генерируется во время гликолиза, используя челночные системы, может передавать восстановительные эквиваленты в митохондриальный матрикс. Путь окислительного фосфорилирования или дыхательная цепь окисляет эти восстановленные динуклеотиды, используя молекулярный кислород в качестве конечного акцептора электронов. Катаболизм жирных кислот протекает через β-окисление, серию реакций, происходящих в митохондриях. Этот процесс снижает НАД⁺ до НАДН, ФАД до ФАДН₂ и генерирует ацетил-КоА. Эти ацетильные группы могут вступать в цикл Кребса или, в условиях избыточного или низкого уровня инсулина, отклоняться в сторону образования кетоновых тел [R.H. Swerdlow, 2014].

Существует ряд точек пересечения, которые способствуют сохранению углерода и его превращению или включению в другие молекулы. Например, пентозофосфатный шунт направляет глюкозу на производство 5-углеродных сахаров, которые используются для генерации нуклеиновых кислот и нуклеотидов, а также углерод-предшественников ароматических аминокислот. Кроме того, прямой поток через эти основные биоэнергетические потоки обычно рассматривается с энергетической и катаболической точки зрения, а случай глюконеогенеза подчеркивает, что происходят и обратные потоки [R.H.Swerdlow, 2014].

В условиях фиксированного расхода энергии анаэробные и аэробные потоки имеют тенденцию взаимно связываться. Эффект Пастера относится к наблюдению, первоначально сделанному на дрожжах, что включение дыхания уменьшает ферментацию и продлевает гликолиз [H.A. Krebs, 1972]. Эффект Крабтри заключается во включении гликолиза вследствие уменьшения дыхания [H.G. Crabtree, 1928]. Совсем недавно был охарактеризован эффект, при котором снижение потока гликолиза ассоциируется с увеличением потока дыхания [R.H. Swerdlow et al., 2013]. В эффекте Варбурга, обусловленном опухолью, наблюдается относительно высокий уровень гликолиза и низкий уровень дыхательного потока [O. Warburg, 1956]. Какие движущие силы в конечном итоге лежат в основе этих эффектов, неясно. Очевидно, что взаимные отношения, подобные этим, способствуют постоянному накоплению энергии или его равновесию, поскольку изменения в выработке АТФ в одной ветви компенсируются противоположными изменениями в продукции АТФ в другом пути [R.H. Swerdlow, 2014].

Интересно, что наиболее дифференцированные ткани биоэнергетически организованы таким образом, чтобы облегчить эти процессы. В частности, в мышцах анаэробные волокна II типа вырабатывают лактат во время гликолиза и его экспортируют. Аэробные волокна I типа затем импортируют лактат, вырабатываемый волокнами типа II, и используют его в качестве дыхательного топлива. Это может создать ситуацию, в которой уменьшение первичного потока в одном пути непреднамеренно уменьшает первичный поток в другом. Значительные данные свидетельствуют о том, что данные процессы существуют в мозге [L. Pellerin et al., 2003, 2005]. Анаэробные астроциты вырабатывают лактат посредством гликолиза и экспортируют этот лактат в относительно аэробные нейроны, дыхательные цепи которых используют его для продуцирования АТФ. Эти биоэнергетические взаимоотношения, вероятно, играют особенно важную роль во время

синаптической активности, вызванной потенциалом действия, и определяют «трехсторонний синапс», который функционально отличается от традиционного двунаправленного синапса [L.Pellerin, P.J. Magistretti, 2004; G.Perea et al., 2009; A. Faissner et al., 2010]. Недавние исследования показали решающую роль лактата в приобретении памяти [A. Suzuki et al., 2011]. Между отдельными органами существует взаимосвязь биоэнергетического промежуточного импорта и экспорта, в частности лактат, вырабатываемый в цикле Кори при тренировке мышц, попадает в кровь и поглощается гепатоцитами печени. Он вступает в глюконеогенез, превращается в глюкозу и повторно поступает в кровь. Таким образом, цикл Кори помогает поддерживать уровень глюкозы в крови во время упражнений [L.E et al., 2013].

В недавнем времени считалось, что митохондрии исключительно являются электростанцией клетки, сейчас признано, что они выполняют множество важных функций помимо производства энергии, влияя на большинство областей клеточной биологии и медицины. Со времени появления молекулярной биологии и открытия патогенных дефектов митохондриальной ДНК в 1980-х годах, успехи исследований выявили ряд распространенных заболеваний человека, которые имеют общий патогенез, связанный с дисфункцией митохондрий. Митохондрии подвергаются функционально-определяющим динамическим изменениям формы, общаются друг с другом, регулируют экспрессию генов в ядре, модулируют синаптическую передачу в мозге, высвобождают молекулы, которые способствуют онкогенной трансформации и системно запускают воспалительные реакции, и влияют на регуляцию сложных физиологических систем. [M. Picard et al., 2016, Б.А. Шендеров, 2018]. Митохондриальная ДНК имеет полиплоидную природу, обладая свойствами гетероплазмии как на внутриклеточном, межклеточном, так и на межтканевом уровне с учетом наследственности или по причине соматических мутаций [Н.А. Литвинова с

соавт., 2015; С. Yan et al. 2019]. Недавно было обнаружено, митохондриальная ДНК подвержена эпигенетическим модификациям, связанным с развитием заболеваний, воздействием окружающей среды, лечением лекарствами и старением. Метилирование мтДНК играет важную роль в регуляции митохондриальных генов. В настоящее время мтДНК рассматривается как потенциальный биомаркер для обнаружения и диагностики заболеваний и понимания клеточного поведения в норме и патологии [V. Iacobazzi et al. 2013; X. Sun et al. 2016].

Группа заболеваний, которые поражают главным образом мышцы и мозг, - митохондриальные энцефаломиопатии, возникают в сочетании с определенными наследуемыми мутациями митохондриальной ДНК [M. Filosto et al., 2007; S. DiMauro et al., 2013; E. Herbers et al., 2019]. Для большинства митохондриальных энцефаломиопатий основная мутация находится в гене митохондриальной ДНК, в том числе вызывая заболевание, опосредуя изменения в функционировании фермента дыхательной цепи [A. Rojo et al., 2006; R.H. Swerdlow, 2009; А.С. Воронкова с соавт., 2016]. Было выяснено, что при дефиците карнитин-пальмитоилтрансферазы аномальный белок находится в митохондриях и напрямую влияет на доставку субстрата по пути β -окисления жирных кислот [J.P. Bonnefont et al., 2004]. При болезни Макардла дефицит миофосфоорилазы предотвращает гликогенолиз, цитозольный путь [A. Lucia et al., 2008].

Существует ряд исследований о влиянии митохондриального метаболизма на процессы нейродегенерации и нейровоспаления. Митохондриальный метаболизм пирувата играет критическую роль в патогенезе нейродегенеративных нарушений, таких как болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера. Митохондриальный носитель пирувата и пируватдегидрогеназа могут модулировать метаболизм пирувата в митохондриях для уменьшения нейровоспаления и нейродегенерации. Кроме того, имеются сведения, что митохондриальный цикл трикарбоновых кислот

может регулировать патогенез нейровоспаления и нейродегенерации, контролируя митохондриальную дисфункцию. Была определена роль митохондриальной ДНК и гаплогрупповые особенности в реализации индивидуального риска развития болезни Паркинсона [N. Nissanka, С.Т. Moraes, 2018; D. Garabadu et al., 2019; Е.М. Франциянц с соавт., 2020; В.С. Сухоруков с соавт., 2020].

Была выявлена митохондриальная дисфункция, а также проведена оценка клеточного энергообмена у детей с дисплазией соединительной ткани и патологическим гастроэзофагеальным рефлюксом [А.А. Зиганшина с соавт., 2017], хроническим гастродуоденитом [И.И. Иванова с соавт., 2019], дисметаболической нефропатией [Э.А. Юрьева с соавт., 2020]. Данные нарушения служат показанием для выявления энергодефицитного диатеза у детей и ранней коррекции патологии энерготропными препаратами.

В настоящее время с использованием современных методов, в частности с применением метода Сэнгера, капиллярного электрофореза, ведется изучение митохондриального генома, который крайне вариабелен, а также поиск болезнетворных вариаций мтДНК которые являются источником большинства патогенных состояний, ведущих к клиническим проявлениям. Эффекты митохондриальных мутаций подразделяют на группы: дефекты генов комплексов дыхательной цепи и дефекты вспомогательных генов, таких как тРНК и рРНК [А.С. Воронкова с соавт., 2017; Н.А. Литвинова с соавт., 2018]. В частности, изучается митохондриальная ДНК в качестве фактора развития синдрома Ли [С.И. Жаданов с соавт., 2008], глаукомной оптической нейропатии [И.Р. Газизова с соавт., 2019].

Нарушение работы митохондрии может происходить по многим причинам, а митохондриальная дисфункция принимает множество различных форм. Выяснение причин нарушений в функционировании митохондрий, а также их последствий заложено в основе терапевтических воздействий для лечения митохондриальных заболеваний [W.J. Koorman et

al., 2012]. На сегодняшний день предложен ряд различных стратегий митохондриальной медицины [R.H. Swerdlow, 2011; G. Pfeffer et al., 2013], в том числе с использованием витаминов, кофакторов, акцепторов электронов и предшественников окислительно-восстановительных молекул. Эти подходы по существу являются частью биоэнергетической медицины. Однако вмешательства в биоэнергетическую медицину могут также непосредственно воздействовать на пути за пределами митохондрий с целью косвенного изменения функции митохондрий и других немитохондриальных параметров [M. Mancuso et al., 2010; P. Sharma, H. Sampath et al., 2019].

Как известно, увеличение отношения НАД⁺/НАДН способствует потоку гликолиза, а уменьшение отношения препятствует ему, регулирование промежуточных продуктов, которые окисляют НАДН или уменьшают НАД⁺, могут модулировать процесс гликолиза. В частности, добавление пирувата или оксалоацетата к культивируемым клеткам увеличивает отношения НАД⁺/НАДН. НАДН восстанавливает оба промежуточных продукта, лактат в случае пирувата и малат в случае оксалоацетата, давая НАД⁺. Тем не менее эти вмешательства имеют совершенно разные последствия: пируват ингибирует активность ферментов гликолиза снижая средние скорости внеклеточного подкисления, оксалоацетат, в свою очередь, не находится непосредственно на пути гликолиза и увеличивает средние скорости внеклеточного подкисления [R.H.Swerdlow, 2014].

В настоящем обзоре были рассмотрены основные соединения промежуточного обмена, переключатели углеводного, липидного, белкового метаболизма – пируват, лактат, оксалоацетат, малат, глицерофосфат, дигидроксиацетонфосфат, а также ферменты, участвующие в этих превращениях. Мы осознанно обратились к ранней литературе «классического этапа» с целью изучения химического строения, механизмов действия, функционирования фермент-субстратных систем. С развитием науки и техники, с учетом накопленных знаний в области геномики,

протеомики, метаболомики, возникает новый интерес к изучению малых молекул, и с 2009 года наступает современный период, посвященный изучению функциональной активности, роли метаболитов, а также выяснение путей биологических процессов, сигнальных каскадных реакций в норме и патологии. Был опубликован ряд исследований, показывающий, что взаимодействия белок – малая молекула могут регулировать и контролировать различные клеточные процессы, играя главную роль в поддержании клеточного гомеостаза.

Наши знания о метаболит-белковых интерактомах недостаточны, несмотря на то, что естественные метаболиты составляют наибольшую долю молекул в клетках. Изменение биоэнергетических потоков клеток влияет на метаболизм в целом, который в свою очередь поддерживает эти потоки, уровни энергии, концентрации органических промежуточных соединений, окислительно-восстановительные состояния и пути, которые как определяют, так и реагируют на эти параметры. Воздействие на биоэнергетические потоки в том числе может повлиять на здоровье человека, эти механизмы и процессы изучаются и корректируются с применением знаний и опыта биоэнергетической и митохондриальной медицины. Дальнейшее изучение влияния малых молекул - пирувата, лактата, оксалоацетата, малата на процессы белок-белкового взаимодействия, изолированные каталитические белки, функционирование фермент-субстратных систем *in vitro* и биологические процессы, происходящие в культуре клеток фибробластов *in vivo* способно выявить важные и еще не изученные роли малых молекул в межмолекулярных процессах.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились на кафедре фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет», в клинико-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.

Исследование проводилось в несколько этапов:

Этап 1. Моделирование *in silico* прогнозируемой биологической активности пирувата, лактата, оксалоацетата и малата в программе Prediction of Activity Spectra for Substances; определение вероятных белковых партнеров взаимодействия для малых молекул в системе Search Tool for Interacting Chemicals.

Этап 2. Анализ и количественная оценка влияния пирувата и лактата на белок-белковое взаимодействие с применением модели группы крови системы АВ0; визуализация белковых комплексов методом конфокальной микроскопии.

Этап 3. Изучение с применением методов дифференциальной сканирующей флуориметрии, капиллярного термофореза конформационных особенностей каталитических белков под влиянием температурного фактора в присутствии малых молекул.

Этап 4. Оценка функциональных проявлений лактатдегидрогеназы, глицерофосфатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы после инкубации с пируватом, лактатом, малатом и оксалоацетатом в диапазоне концентраций.

Этап 5. Изучение пролиферативной активности культуры клеток дермальных фибробластов под влиянием пирувата, лактата, оксалоацетата и малата.

Экспериментальная часть диссертационной работы проводилась согласно дизайну исследования (рисунок 2.1).

2.1 Материалы исследования

- моноклональные антитела анти-А, анти-В «ЭритроТест» (Россия);
- стандартные эритроциты фирмы Revers Cell (США);
- моноклональные антитела мечеными флуоресцеинизотиоционатом Blood group A antigen, Blood group B antigen, Blood group AB antigen (Santa Cruz biotechnology, США);
- растворы малых молекул фирмы Sigma-Aldrich, США: лактата натрия, дигидроксиацетонфосфата, глицерофосфата, оксалоацетата, малата; пирувата натрия (Applichem, Германия)
- каталитические белки:
 - глицерофосфатдегидрогеназа (EC 1.1.1.8) (Sigma-Aldrich, США);
 - лактатдегидрогеназа (EC 1.1.1.27) (Sigma-Aldrich, США);
 - малатдегидрогеназа (EC 1.1.1.37) и лактатдегидрогеназа (EC 1.1.1.27) (Roche Diagnostics, Германия);
- буферные растворы фирмы Sigma-Aldrich, США:
 - фосфатный буфер;
 - Трис-буфер
- набор для маркировки белка «Monolith NT Protein Labeling Kit RED-NHS» (NanoTemper Technologies, Германия)

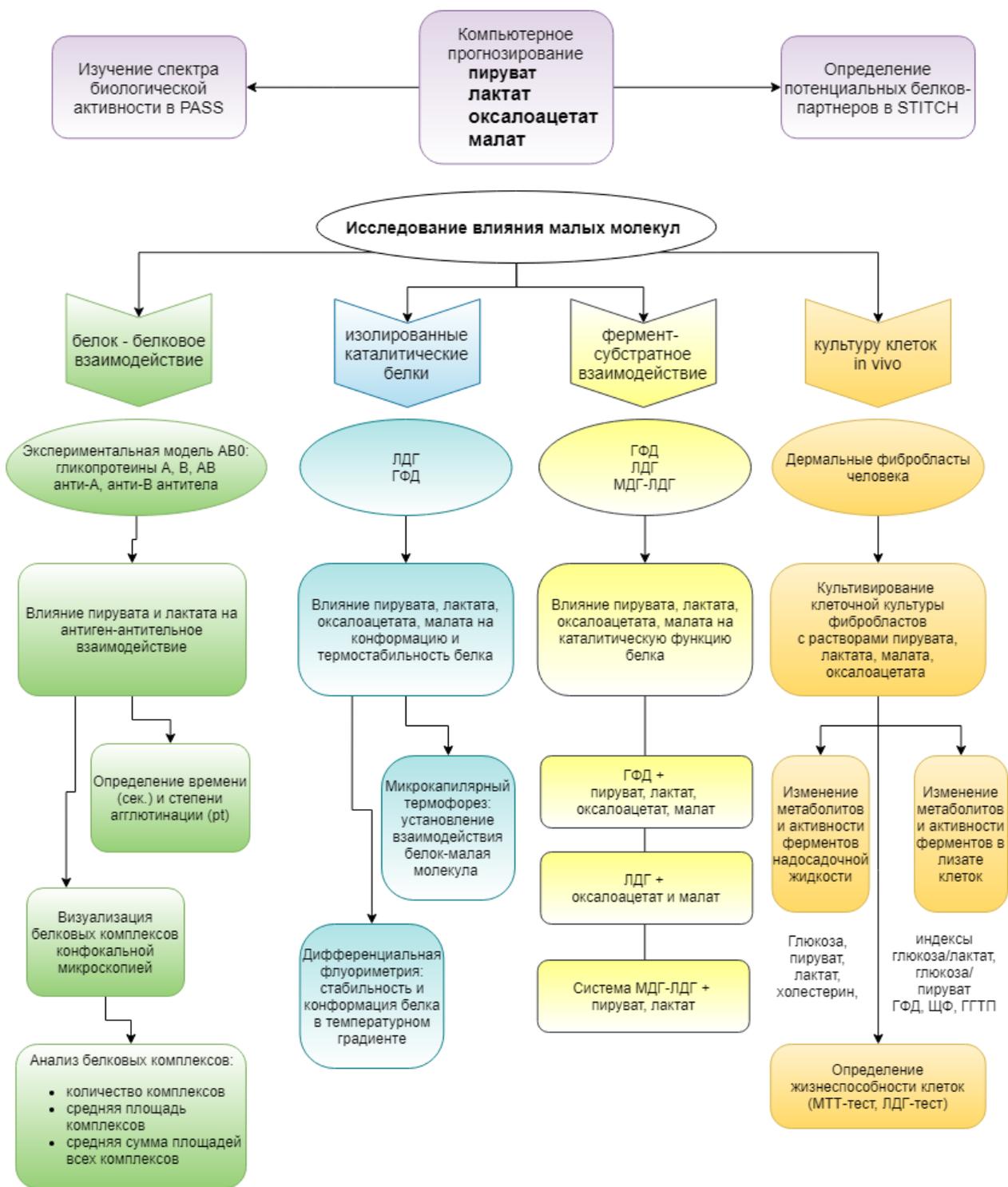


Рисунок 2.1 – Дизайн исследования

Растворы малых молекул готовили *ex tempore* для каждой постановки серии экспериментов, что связано с нестабильностью растворенных естественных интермедиатов, в частности, наблюдается самопроизвольное декарбоксилирование оксалоацетата в пируват [H.M.Wilkins et al., 2014].

2.2. Компьютерное моделирование биологической активности малых молекул

Моделирование прогнозируемой биологической активности *in silico* на основе его структурной формулы с использованием единого описания химической структуры и универсального математического алгоритма установления зависимостей «структура-активность» ранее проводили в программе Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS) [V.V. Poroikov et al., 2003, F.N. Gilmiyarova et al., 2016]. Спектр биологической активности, прогнозируемый компьютерной системой PASS включает в себя фармакологические эффекты, молекулярные механизмы действия, специфическую токсичность, побочное действие, метаболизм, а также влияние на нежелательные мишени, молекулярный транспорт, генную экспрессию. Описание структуры соединения основано на его структурной формуле, с использованием дескрипторов MNA (Multilevel Neighborhoods of Atoms – многоуровневые атомные окрестности), с учетом поиска зависимостей «структура–свойство» для гетерогенных выборок. Результат прогноза биологической активности представляется в PASS в виде вероятностей P_a «быть активным» («to be active») и P_i «быть неактивным» («to be inactive»). Прогноз спектра биологической активности получили в виде упорядоченного списка оценок вероятностей P_a и P_i , при этом более вероятные виды активности находятся в верхней части спрогнозированного спектра. Использование компьютерного моделирования в системе PASS может в десятки раз сократить объем необходимого экспериментального тестирования по сравнению со слепым поиском [Д.А. Филимонов с соавт.,

2014, 2018]. Мы учитывали спрогнозированный спектр активности $P_a > P_i$, при этом анализировали активности с $P_a > 0,5$.

Определение потенциальных белковых партнеров взаимодействия для малых молекул выполняли в системе Search Tool for Interacting Chemicals (STITCH) версии 5.0. (Инструмент поиска взаимодействующих химических веществ).

Платформа STITCH разделяет белковое пространство со STRING v10 и в настоящее время включает более 9 600 000 белков из 2031 эукариотического и прокариотического геномов, химическое пространство составляет 430 000 соединений (не включая различные стереоизомеры). STITCH доступен через новый переработанный веб-интерфейс по адресу <http://stitch.embl.de> [D. Szklarczyk et al., 2016].

Данная программа объединяет данные об имеющихся взаимодействиях между белками и малыми молекулами из библиотек DrugBank [V. Law et al., 2014], база данных GPCRligand (GLIDA), Matador, База данных терапевтических целей (TTD), База данных сравнительной токсикогеномики (CTD) [A.P. Davis et al., 2015] Киотская энциклопедия генов и геномов (KEGG) [M. Kanehisa et al., 2014], NCI / базу данных о взаимодействии природных путей, Reactome и BioCyc [R. Caspi et al., 2014]. Так как между разными наборами данных, созданными вручную, могут возникать совпадения, в STITCH учитываются повторяющиеся взаимодействия только один раз. Другими крупными источниками межмолекулярных связей являются наборы данных экспериментально подтвержденных взаимодействий, которые включают ChEMBL [A.P. Bento et al., 2014], PDSP Ki Database, Protein Data Bank и два высокопроизводительных исследования взаимодействий киназа-лиганд [M.I. Davis et al., 2011]. Источники проверенных белково-химических взаимодействий дополняются автоматизированным анализом текста и методом прогнозирования на основе структуры. Конвейер интеллектуального анализа текста включает в себя

совместное копирование и обработку всех рефератов MEDLINE, а также доступные полнотекстовые статьи PubMed Central с открытым доступом. При этом учитывались рефераты грантов NIH RePORTER (<https://projectreporter.nih.gov/>) [M. Kuhn et al., 2014].

Чтобы оценить эффект и достоверность связывания белок-лиганд, а также изменчивость аффинности известных лигандов, важно знать аффинность связывания между соединением и его мишенью. Обычно это сродство связывания количественно определяют, как константу ингибирования K_i , также учитываются значения IC50 или EC50 (половина максимальной ингибирующей концентрации) [D. Szklarczyk et al., 2016].

Для поиска по идентификаторам и общим названиям химических веществ, которые хранятся в базе данных сведений о малой молекуле, применяли стандартную запись SMILES. Сеть взаимодействия может быть отображена и настроена по степени доказательности (evidence), уверенности (confidence), молекулярному действию (molecular action) или аффинитету связи (binding affinity). В своей работе мы использовали понятие аффинитета связи. Программой может быть спрогнозировано число взаимодействий в заданном пороге достоверности от 0 до 1 (низкий, средний, высокий, высочайший), нами использовался средний порог достоверности ($P > 0,4$) [M. Kuhn, 2014].

2.3. Модель для изучения белок-белкового взаимодействия. Определение группы крови по системе АВ0

Впервые группы крови системы АВ0 были открыты австрийским ученым К. Ландштейнером в 1901 г. Группоспецифические антигены представлены ди-, три- или тетрасахаридными структурами на терминальных участках полисахаридных цепей, соединенными гликофинголипидами и трансмембранными белками Band 3 и гликофоринами с мембраной эритроцита. Антиген Н образуется путем присоединения к терминальной

галактозе цепи-предшественника фукозы, с помощью α -2-L-фукозилтрансферазы, являясь предшественником для формирования антигенов А или В. N-ацетилгалактозаминтрансфераза формирует А антиген, присоединяя N-ацетилгалактозамин, галактозилтрансфераза формирует В антиген, присоединяя галактозу. В том случае, если цепь Н-антигена остается нетрансформированной, это соответствует группе крови 0(I). Функционирование сразу А- и В-трансферазы формирует АВ-фенотип [С.М. Льюис с соавт. 2009].

Группа крови по системе АВ0 является перспективным объектом для исследования межмолекулярных взаимодействий. В качестве модели для изучения белок-белкового взаимодействия использовали систему АВ0 групп крови (патент № 2484480 от 10.06.2013). Для изучения межбелковых взаимодействий инкубировали антигены А и В, а также естественные антитела с малыми молекулами. В качестве активных молекул использовали раствор пирувата (2 мМ) и раствор лактата (2 мМ). Условия были подобраны экспериментально. Время инкубации – 5 мин. - было подобрано эмпирически. Эритроциты в объеме 100 мкл инкубировали с 20 мкл раствором малых молекул, затем проводили прямую агглютинацию с моноклональными анти-А, анти-В антителами. Затем, 100 мкл плазмы инкубировали с 20 мкл раствором малых молекул, далее проводили прямую агглютинацию со стандартными эритроцитами. В качестве контрольных проб использовали постановку агглютинации антигенов А и В II, III, IV групп крови с моноклональными антителами. Контроль значения рН проводили в контрольных и опытных пробах с помощью рН-метра Mettler Toledo (США). Изменение рН среды имело колебания в пределах 0,01-0,02.

Учитывали время наступления в секундах и степень выраженности агглютинации. Степень агглютинации подсчитывали с использованием методики бальной оценки интенсивности агглютинации (pt) [W.L Marsh., 1972] (таблица 2.1).

Таблица 2.1 – Учет степени агглютинации в образцах групп крови O(I) – AB(IV) (Marsh W.L., 1972).

Значение агглютинации	Числовое значение агглютинации	Описание
4+	12 pt	Комплекс образует один комок, осадок виден макроскопически
3+	10 pt	Комплекс представлен несколькими крупными комками, виден макроскопически
2+	8 pt	Комплекс представлен множеством мелких комочков, виден макроскопически
1+	5 pt	Комплекс представлен мельчайшими зернистыми комочками, макроскопически слабо заметен
(+) или w (слабая)	3 pt	Комплекс представлен мельчайшими гранулами, видимыми только под микроскопом
-	0 pt	Отрицательный результат – все клетки свободно и равномерно распределены

Определение группы крови по системе АВ0 проводили перекрестным методом на плоскости с использованием моноклональных антител анти-А, анти-В, антиАВ (ООО «Гематолог») и стандартных эритроцитов O(I), A(II), B(III) групп (ГБУЗ «Самарская областная клиническая станция переливания крови»). Перекрестный метод определения группы крови подразумевает параллельное определение антигенов А и В на исследуемых эритроцитах и естественных анти-А и анти-В антител в сыворотке. Использовали цельную кровь, взятую в вакуумную пробирку с консервантом К₂ЭДТА по стандартной методике [Приказ №2, 1998].

Естественные анти-А и анти-В антитела определяли в реакции прямой агглютинации стандартных эритроцитов А1 и В с сывороткой. На промаркированную пластину наносили по одной капле 100 мкл стандартных эритроцитов в следующем порядке слева направо: А(II), В(III), АВ(IV). Из

пробирки, содержащей кровь обследуемого, пипеткой извлекали сыворотку и накапывали её по одной капле 100 мкл на подготовленные стандартные эритроциты. Во всех каплях сыворотку перемешивали с эритроцитами сухой стеклянной палочкой, пластинку покачивали. Наблюдение за ходом реакции проводили не менее пяти минут. По мере наступления агглютинации, но не ранее, чем через три минуты, в те капли, в которых она наступила, добавляли по одной капле (50 мкл) изотонического раствора натрия хлорида и продолжали наблюдение при покачивании пластинки до истечения пяти минут, далее проводили оценку реакции агглютинации.

Антигены А и В А(II), В(III), АВ(IV) групп крови определяли в реакции прямой агглютинации на плоскости с помощью моноклональных антител, содержащих полные анти-А или анти-В, анти-АВ антитела. Моноклональные антитела, созданные с помощью гибридной технологии, продуцируются двумя мышинными гибридами и изготавливаются из асцитной жидкости мышей-носителей анти-А и анти-В гибридом, анти-АВ антитела представляют собой смесь двух гибридом. Моноклональные антитела принадлежат к иммуноглобулинам класса М.

На маркированную пластину наносили моноклональные анти-А, анти-В, анти-АВ антитела по 100 мкл, а рядом с ними – по капле исследуемой крови 10 мкл, после чего смешивали кровь и реагенты. Наблюдение за ходом реакции проводили в течение трех минут, визуальное при легком покачивании пластины.

Групповое определение крови проводили на автоматическом иммуногематологическом анализаторе Hemos SP II (Bio-Rad, США). Использовали набор коммерческих реактивов TransClone Anti-AB01 (А), Anti-AB02 (В), Anti-AB03 (АВ) (Bio-Rad, США). Данный анализатор представляет собой автоматизированную иммуногематологическую систему определения групповой принадлежности крови по системе АВ0, образцы крови и реагенты вносятся с использованием микропланшетной технологии,

совмещенной в единую информационную базу с ридером для микропланшет, считывающую и регистрирующую результаты (таблица 2.2).

Таблица 2.2 – Интерпретация результатов агглютинации группы крови системы АВ0

Агглютинация эритроцитов с моноклональными антителами:			Агглютинация сыворотки со стандартными эритроцитами:		Групповая принадлежность
анти-А	анти-В	анти-АВ	А1	В	
-	-	-	+	+	0(I)
+	-	+	-	+	А(II)
-	+	+	+	-	В(III)
+	+	+	-	-	АВ(IV)

*Знаком плюс (+) обозначено наличие агглютинации, знаком минус (-) - отсутствие агглютинации.

2.4. Визуализация белковых комплексов с малыми молекулами с применением конфокальной микроскопии

Визуализацию белковых комплексов, инкубированных с малыми молекулами пируватом и лактатом осуществляли с использованием конфокальной микроскопии. Оптический принцип лазерной сканирующей микроскопии, позволяет получать серии изображений на разных глубинах фокальной плоскости, благодаря использованию диафрагмы, способной отсекают потоки фонового рассеянного света и отличается более высокой контрастностью в сравнении с классической микроскопией [J.Jonkman, С.М. Brown, 2015].

Подсчет содержания эритроцитов цельной крови осуществлялся на гематологическом анализаторе Sysmex КХ 21 (Roche Diagnostics,

Швейцария), затем достигалось разведение 1×10^6 /л эритроцитов с помощью солевого раствора FAX flow. Осуществляли преинкубацию 100 мкл полученного разведения эритроцитов с 20 мкл лактата или пирувата в конечной концентрации 2 мМ в течение 5 минут. В последующем проводили реакцию агглютинации гликопротеинов А и В со специфическими мечеными антителами: моноклональные конъюгированные антитела Blood group A antigen, Blood group B antigen. В качестве флуоресцентной метки использовался флуоресцеинизотиоционат (ФИТЦ) фирмы Santa Cruz biotechnology, Inc. (США). Контрольная проба не содержала лактата и пирувата. Контроль значения рН проводили с помощью рН-метра Mettler Toledo (США). Время постановки реакции – 20 минут в условиях затемненного помещения.

Визуализация белок-белкового взаимодействия была реализована с применением экспериментальной установки, созданной на базе конфокального оптического микроскопа (Olympus, Япония) и лазерного комбайна фирмы ANDOR. Регистрация микрофотографий проводилась в двух режимах: основного рассеивания и флуоресценции. При работе в режиме рассеивания источником излучения служила галогеновая лампа, в режиме флуоресценции - излучатели мощностью 100 мВт, длины волны 488 и 561 нм [В.П. Захаров с соавт., 2013].

В режиме конфокальной микроскопии свет от галогеновой лампы поступает на систему фокусировки, которая фокусирует излучение на объекте. Прошедшее через объект излучение собирается объективом и вводится в сканирующий конфокальный блок. Перемещение фокальной плоскости осуществляется за счет управляемого с компьютера пьезоэлектрического z-микросканера, с установленным на нем объектом исследования. Спектральная фильтрация излучения осуществляется в блоке системы сменных фильтров, что позволяет повысить контрастность изображения. Далее излучение вводится в камеру размером 1024*1024, время

экспозиции 40мс-10мин. С целью снижения темновых токов матрица камеры охлаждается до температуры -75 С.

Обработка полученных микроснимков проводилась в программе JMicroVision 1.2.7. Размер полученных микроснимков составлял 400х400 мкм, разрешение – 400 нм на пиксель. 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 [Н.А. Колотьева с соавт., 2016; F.N. Gilmiyarova et al., 2020].

Нами был разработан способ для визуализации белковых комплексов в условиях влияния молекул с небольшой молекулярной массой с целью количественной оценки результатов взаимодействий с использованием лазерной сканирующей микроскопии (заявка на патент 2020116810 «Способ выявления влияния низкомолекулярных биологически активных соединений на взаимодействие антиген-антитело»).

Мы оценивали влияние естественных интермедиатов на белок-белковое взаимодействие (таблица 2.3).

Предложенный способ позволил стандартизировать процедуру обработки полученных результатов и получить объективную оценку протекания реакции антиген-антитело, а также детализировать влияние отдельных низкомолекулярных биологически активных соединений на протекание реакции антиген-антитело.

Таблица 2.3 – Оценка влияния низкомолекулярных биологически активных соединений на протекание межбелкового взаимодействия

Изменение отношения контрольной пробы к опытной	> 35%	< - 35%	Диапазон -35% до 35%
Влияние низкомолекулярного биологически активного соединения	усиливает протекание реакции антиген-антитело	замедляет протекание реакции антиген-антитело	отсутствии влияния на протекание реакции антиген-антитело

2.5. Способ оценки с помощью микрокапиллярного термофореза взаимодействия каталитических белков с малыми молекулами

Применение микрокапиллярного термофореза позволяет определить наличие комплексов и силу взаимодействия между каталитическими белками глицерофосфатдегидрогеназа и лактатдегидрогеназа и исследуемыми малыми молекулами (пируват, лактат, оксалоацетат, малат), благодаря изменению их подвижности в температурном градиенте. Эксперименты проводились на приборе Monolith NT.115, NanoTemper Technologies GmbH (Германия). Данный метод контролирует направленные движения флуоресцентных молекул через микроскопические температурные градиенты в объеме, и осуществляет точные количественные оценки разнообразных биомолекулярных взаимодействий в растворе, в том числе белок–белок, белок–лиганд, белок – ДНК, белок – РНК [M. Jerabek-Willemsen et al., 2011, K. Zillner et al., 2012]. Последние технические достижения в настоящее время позволяют использовать собственную флуоресценцию триптофансодержащих белков в соответствии с их термофорезом, обеспечивая тем самым новый подход к изучению молекулярных

взаимодействий, без меток и без иммобилизации [C.J. Wienken et al., 2010, S.A. Seidel et al., 2013].

Разница температур ΔT в пространстве приводит к истощению сольватированных биомолекул в области повышенной температуры, что количественно определяется коэффициентом $Core S_T : c_{hot}/c_{cold} = \exp(S_T \Delta T)$. Это термофоретическое истощение зависит от границы раздела между молекулой и растворителем. Образование комплекса молекулы с лигандом приводит к изменению заряда молекулы, ее размера и гидратной оболочки, а также энтропии сольватации молекул, что влияет на термофоретическую подвижность молекул-партнеров. Сопоставляя термофоретические кривые для молекул при разной концентрации лиганда, программное обеспечение вычисляет константу диссоциации, характеризующую силу взаимодействия молекулы с лигандом, аффинность. [S.A. Seidel et al., 2013].

Изменения в термофорезе флуоресцентных молекул вследствие связывания с лигандом выражается как изменение в нормированной флуоресценции (ΔF_{norm}), которая определяется как отношение значениям флуоресценции в области высоких температур к значениям флуоресценции в области низких температур $\Delta F_{norm} = F_{hot}/F_{cold}$. Далее получили количественные параметры связывания молекул-партнеров с использованием серий разведений одной из молекул, построили график зависимости ΔF_{norm} от логарифма концентраций [C.J. Wienken et al., 2010, S.A. Seidel et al., 2013].

Мечение глицерофосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы проводили с использованием коммерческого набора для маркировки белка «Monolith NT Protein Labeling Kit RED-NHS» (NanoTemper Technologies, Германия). С помощью красителя NT-647-NHS, содержащего реакционноспособный активированный N-гидроксисукцинимидный эфир (NHS), производили ацилирование алифатической ϵ -аминогруппы лизина с образованием высокостабильных конъюгатов краситель-белок. Каталитические белки глицерофосфатдегидрогеназу и лактатдегидрогеназу

растворяли с использованием буфера трис-НСl рН 7,5, концентрацию ферментов довели до 20 мкМ. Поскольку глицерофосфатдегидрогеназа стабилизирована сульфатом аммония, проводили процедуру очистки белка от сульфата аммония с применением метода гель-фильтрации согласно инструкции «Monolith NT Protein Labeling Kit RED-NHS» с использованием колонок с гелем и обменного буфера. Далее готовили раствор флуоресцентного красителя NT-647-NHS, растворяя в 100% ДМСО в конечной концентрации 470 мкМ. Концентрацию красителя довели до 60 мкМ с использованием буфера для мечения, далее смешивали белок и флуоресцентный краситель в соотношении 1:1 и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте. С помощью стандартных гельфильтрационных колонок (B-Column) удаляли непрореагировавший «свободный» краситель. Далее проводили серию постановок микрокапиллярного термофореза на приборе Monolith NT.115, NanoTemper Technologies GmbH.

С целью определения константы диссоциации (K_d) методом микротермофореза делали серию разведений малых молекул оксалоацетата, малата, пирувата и лактата от 40 мкМ до 0,0012 мкМ (16 концентраций), конечная концентрация меченного белка подбиралась эмпирически, была постоянной (0,8 мкМ для глицерофосфатдегидрогеназы; 1,65 мкМ для лактатдегидрогеназы). Комплексы белок-малая молекула инкубировались при температуре 25°C в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl (Sigma, США), рН 7,5. Раствор с исследуемым каталитическим белком с флуоресцентной меткой в постоянной концентрации и малые молекулы в нарастающей концентрации помещали в капилляры по 4 мкл. Далее регистрировали начальную флуоресценцию. Для измерений использовали инфракрасный фильтр с интенсивностью 40%, интенсивность светоизлучающего диода составляла 100% [А.О. Михайлина с соавт., 2017]. Полученные результаты

обрабатывали автоматически, константу диссоциации рассчитывали с использованием программного обеспечения NT Analysis Software.

2.6 Изучение влияния малых молекул на конформационную структуру белка с применением дифференциальной сканирующей флуориметрии

Определение изменения конформационной структуры белковых молекул глицерофосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы под влиянием пирувата, лактата, оксалоацетата, малата проводили с использованием дифференциальной сканирующей флуориметрии (Differential Scanning Fluorimetry, DSF) на приборе Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies, Германия). Данный метод способен анализировать фолдинг белка, а также его конформационную и коллоидную стабильность белков в различных термических и химических условиях. Конформационную стабильность белка описывали его средней температурой денатурации T_m ($^{\circ}\text{C}$), которая является точкой, где разворачивается половина белка. Принцип дифференциальной сканирующей флуориметрии основан на изменении эндогенной флюоресценции триптофана и тирозина, которая очень чувствительна и изменяется при термическом разворачивании. Результат регистрируется в градусах цельсия, что соответствует температуре «разворачивания» белка (T_m) [C.G. Alexander et al., 2014].

Система позволяет заполнить 48 капилляров 10 мкл образца и одновременно сканировать при длинах волн 330 и 350 нм. Температуры плавления регистрировали путем мониторинга изменений собственной флуоресценции триптофана, а температуры начала агрегации регистрировали с помощью рассеяния света с обратным отражением. Собственная флуоресценция белков зависит от положения и локального окружения гидрофобной аминокислоты триптофана. Использование термического градиента вызывает денатурацию третичной структуры, белок

разворачивается, что способствует выходу гидрофобных участков с триптофаном из карманов. Это приводит к сдвигу пиков флуоресцентного излучения, дифференциальная сканирующая флуориметрия отслеживает эти изменения с высоким временным разрешением и может выявить даже несколько разворачивающихся переходов [G.R.Grimsley et al., 2013].

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. Помещали 10 мкл полученного раствора в капилляры Prometheus NT.48, nanoDSF grade (Германия). Сканирующую флуориметрию проводили при интенсивности лазера 30%, диапазон нагрева от 20°C до 95°C, шаг 1°C /мин.

Было проанализировано влияние различных концентраций оксалоацетата, пирувата, лактата, малата на соотношение флуоресценций лактатдегидрогеназы (350/330 нм) в физиологическом диапазоне температур (36,5-37,5 °C). Из основного массива данных отобраны наблюдения на 29 температурах от 36,530°C (время 1037,6) по 37,545°C (время 1098,5) включительно. Сравнения данных пар метаболитов представлены в виде среднего и стандартного отклонения ($M \pm SD$) и на гистограммах (медиана, квартили, минимум-максимум). Сравнения пар лигандов выполняли по критериям Стьюдента и Манна-Уитни-Вилкоксона, сравнения различных концентраций каждого лиганда — с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующими апостериорными сравнениями с контролем либо между всеми возможными комбинациями попарных сравнений из изученных концентраций по критерию Даннетта.

2.7 Изучение влияния малых молекул на фермент-субстратное взаимодействие

Влияние биологически активных соединений на активность глицерофосфатдегидрогеназной, лактатдегидрогеназной, малатдегидрогеназной систем изучалось путем постановки фермент-субстратной реакции на автоматическом биохимическом анализаторе Cobas Integra 400 plus (Roche Diagnostics, Швейцария).

Для оценки действия оксалоацетата и малата на лактатдегидрогеназную систему нами была приготовлена серия разведений растворов малых молекул в конечной концентрации 1 мкМ, 10 мкМ, 0,1 мМ, 1 мМ, 1,5 мМ, 2 мМ и 5 мМ.

Принцип метода основан на катализирующей лактатдегидрогеназой реакции:
 $L\text{-лактат} + \text{НАД}^+ \leftrightarrow \text{пируват} + \text{НАДН} + \text{H}^+$

Влияние пируватата, лактата, оксалоацетата и малата в конечной концентрации 1 мкМ, 10 мкМ, 0,1 мМ, 1 мМ на функционирование глицерофосфатдегидрогеназы изучалось спектрофотометрическим методом путем постановки реакции:
 $\text{глицерофосфат} + \text{НАД}^+ \leftrightarrow \text{дигидроксиацетонфосфат} + \text{НАДН} + \text{H}^+$

Влияние пируватата и лактата в конечных концентрациях 0,01 мкМ, 0,1 мкМ, 1 мкМ, 10 мкМ на функционирование системы малатдегидрогеназа - лактатдегидрогеназа изучалось путем постановки параллельных реакций с двумя каталитическими белками. Принцип метода основан на катализирующей малатдегидрогеназой реакции:

$L\text{-малат} + \text{НАД}^+ \leftrightarrow \text{оксалоацетат} + \text{НАДН} + \text{H}^+$

Серия экспериментов с дегидрогеназами включала контрольные пробы - содержали буфер и каталитический белок, и опытные пробы, которые включали в себя буфер, изучаемую малую молекулу в различной концентрации и фермент. Конечные концентрации малых молекул были подобраны эмпирическим путем. Контроль значения рН проводили до и

после внесения растворов исследуемых малых молекул в пробы с помощью рН-метра Mettler Toledo (США). Изменение рН среды имело колебания в пределах 0,01-0,02. Инкубацию каталитического белка и биологически активного соединения проводили при комнатной температуре 25°C в течение 5 минут, время было подобрано экспериментально. Старт биохимических реакций начинали на борту анализатора.

В опытных и контрольных образцах определяли содержание белка методом пирогаллоловым красным. Принцип метода заключается в образовании окрашенного комплекса аминокислот белка с молибдатом натрия и пирогаллоловым красным. Интенсивность окраски полученного комплекса прямо пропорциональна содержанию белка в пробе, которую измеряли при длине волны 583 нм. Для выражения активности фермента производили расчет удельной активности фермента, МЕ/мг белка.

2.8. Влияние малых молекул на клеточную культуру фибробластов

Фибробласты выращивали по методике первичных эксплантатов [К.Н. Гринберг с соавт., 1988] с использованием полной ростовой среды (среда 199 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 40 мкг/мл гентамицина) в CO₂ –инкубаторе MCO-17AI (Sanyo, Япония) при постоянной температуре 37°C и влажности с 5% CO₂. Перед исследованием выращенная культура была идентифицирована и охарактеризована с помощью морфологических и молекулярно-генетических методов. Установлено, что клетки являются детерминированными и принадлежат к фибробластическому дифферону. Обследование методом ПЦР показало отсутствие контаминации культуры инфекционными агентами, в том числе микоплазмами и цитомегаловирусом. Малые молекулы лактат, пируват, малат, оксалоацетат, разводили 10 мМ фосфатным буфером рН=7,4. После подготовки раствора малых молекул проводился контроль рН с помощью рН-метра Mettler Toledo (США). Клетки высевали в 96-луночный планшет в

дозе 2×10^4 клеток /см², при посеве к клеткам были добавлены исследуемые соединения в конечной концентрации 1,5 мМ. Клетки инкубировали с малыми молекулами 120 часов при 37⁰С в атмосфере СО₂. Для каждого соединения эксперименты были выполнены в 4 повторах. Контролем служили культуральная среда фибробластов, инкубированных без малых молекул и полная культуральная среда.

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 400+ (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. О восстановительной способности митохондрий судят по интенсивности окраски, регистрируемой спектрофотометрически [Л.В. Аникина с соавт., 2014]. После инкубации с малыми молекулами в каждую лунку добавляли 20 мкл МТТ (бромид 3-(4,5-диметитиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) с последующей инкубацией в течение 2 часов. Далее среду удаляли, в планшеты вносили 100 мкл ДМСО для растворения кристаллов 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 под действием исследуемого фактора) и лизате прикрепленных клеток (оценивалось количество жизнеспособных клеток после воздействия исследуемого фактора), затем

рассчитывали процент погибших клеток от общего количества лизированных и жизнеспособных клеток [F. Wroblewski et al., 1955]. Для проведения данного теста использовали спектрофотометр СФ-56 (ЛОМО-Спектр, г.С.-Петербург, Россия), длина волны 340 нм.

2.9 Статистическая обработка данных

Предварительные подсчеты проводили в программе MS EXCEL 2016 с последующим статистическим анализом в пакете прикладных программ SPSS 12.0 (IBM SPSS Statistics, США). Было установлено, что большинство данных имеет нормальное распределение, доказанное с помощью критерия Колмогорова-Смирнова, поэтому нами были использованы параметрические 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, если сравнивали средние значения трех и более групп применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Критическое значение уровня значимости принимали равным 0,05.

Для данных, имеющих не нормальное распределение, использовали непараметрический анализ с использованием 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 биологически активных соединений на конформацию каталитического белка лактатдегидрогеназы в диапазоне физиологической температуры 36,5-37,5°C использовали сравнение различных концентраций малых молекул, с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующими апостериорными сравнениями с контролем либо между всеми возможными комбинациями попарных сравнений из изученных семи концентраций по критерию Даннетта.

ГЛАВА III.

БЕЛОК-БЕЛКОВОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

3.1. Изучение *in silico* биологических свойств пирувата и лактата

3.1.1. Оценка биологической активности пирувата и лактата в программе PASS

Биологическая активность является основной характеристикой соединений с известной химической формулой, так как её наличие может стать базой для использования данного вещества в медицине, либо, лимитировать его применение из-за проявления нежелательных побочных или токсических эффектов [Д.А. Филимонов с соавт., 2018]. Очень сложно, как с экономической, так и с практической стороны, экспериментально оценить межмолекулярное взаимодействие миллионов химических соединений с тысячами лигандов [С. Lipinski, А. Hopkins, 2004]. Считается целесообразным проводить предварительное исследование конкретных химических веществ методом оценки биологической активности *in silico*. С этой целью в настоящее время широко применяют современные компьютерные методы оценки и дизайна химических соединений [V.V. Poroikov et al., 2003; W.L. Jorgensen, 2004]. Программное обеспечение PASS версии 1.917 (Prediction of Activity Spectra for Substances), предназначено для предсказания спектра биологической активности соединения по его структурной формуле на основе анализа зависимостей “структура-активность” с применением обучающей выборки соединений. Имеется информация о структурах и известных видах биологической активности более миллиона молекул в используемой программе. Дескрипторы атомных окрестностей (Multilevel Neighborhoods of Atoms) необходимы для описания структуры молекул органического соединения, алгоритм на основе “наивного Байесовского подхода”, а также зависимостей “структура-активность”,

определяемых при изучении обучающей выборки позволяют осуществить предсказание активности для новых соединений [Д.А. Филимонов с соавт., 2018]. Предсказанный спектр биологической активности исследуемого вещества состоит из различных эффектов: фармакологический, токсический; и механизмов действия: молекулярный, побочный, а также влияние на метаболизм, мишени, транспорт, экспрессию генов. Результат прогноза биологической активности представляется в данной программе в виде вероятностей P_a «быть активным» («to be active») и P_i «быть неактивным» («to be inactive») имеющие значения от 0 до 1, мы приняли P_a более 0,5 за оптимальное значение вероятности наличия активности. Точность прогноза каждой активности оценивается как вероятность того, что для произвольной пары новых соединений значение P_a для активного соединения будет выше, чем значение P_a для неактивного соединения, и называется инвариантной точностью прогноза (IAP) [V.V. Poroikov et al., 2003; Д.А. Филимонов, 2006].

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 с соавт., 2016; Ф.Н. Гильмиярова с соавт., 2016; 2017]. Ниже будут приведены суммированные данные и анализ оказываемых биологических эффектов изучаемых молекул в сравнительном аспекте.

В компьютерной среде PASS существует возможность проанализировать всего 2736 видов биологической активностей, из них 384 фармакологических эффектов, 2242 молекулярных механизмов действия, 41 побочных и токсических эффектов и 69 метаболически опосредованных действий. Анализируя полученные данные, хочется отметить, что для пирувата всего спрогнозировано большее количество биологических активностей, чем для лактата (1926 и 1792 соответственно), пируват активнее проявляет способность оказывать фармакологические эффекты (257) и молекулярные

механизмы действия (1578) по отношению к лактату. Стоит отметить, что у лактата количество проявления побочных, токсических и метаболически опосредованных действий больше в сравнении с пируватом (рисунок 3.1).

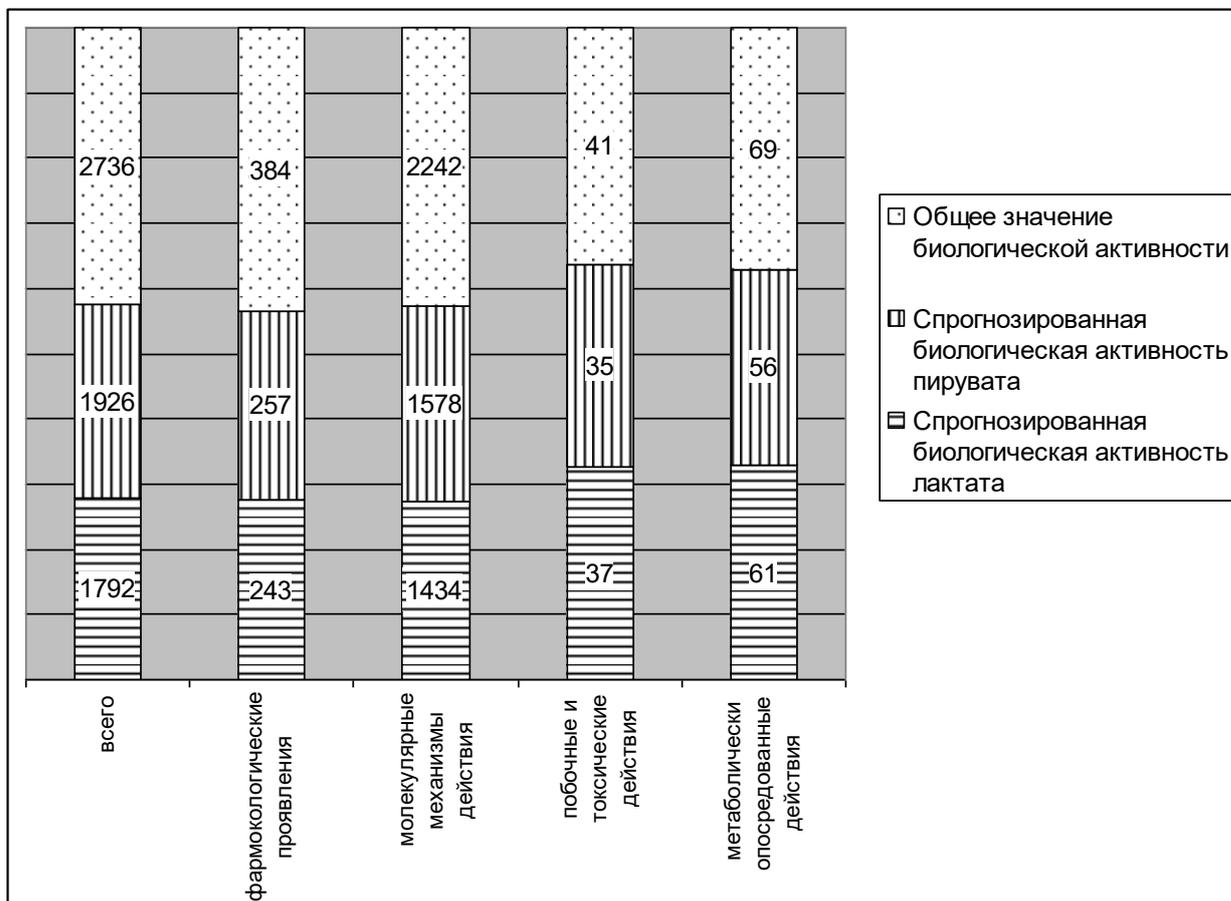


Рисунок 3.1 – Оценка спрогнозированной биологической активности пирувата и лактата

Изученные спрогнозированные фармакологические проявления представлены в таблице 3.1. Полученные сведения свидетельствуют о том, что пируват и лактат влияют на клеточные процессы: выступают в качестве цитопротекторов, стимуляторов лейко- и эритропоэза, агрегации тромбоцитов, ингибиторов тромбопоэза и адгезии тромбоцитов, за счет способности активировать сигнальный путь фактор индуцируемый гипоксией 1 (HIF-1 α) - эритропоэтин (EPO) [Y. Wang et al., 2018].

Таблица 3.1 – Прогнозируемые эффекты пирувата и лактата в программе PASS

Фармакологический эффект	Pa пирувата	Pi пирувата	Pa лактата	Pi лактата	Экспериментально подтвержденные данные
Фибринолитический	0,812	0,004	0,716	0,024	Maekawa K., 2019
Регулятор обмена липидов	0,812	0,006	0,784	0,008	Кржечковская В.В., 2004
Гиперхолестеролемический	0,757	0,003	0,727	0,019	
Стимулятор лейкопоэза	0,727	0,005	0,803	0,003	Wang Y. et al., 2018
Стимулятор агрегации тромбоцитов	0,706	0,005	0,353	0,009	
Стимулятор эритропоэза	0,698	0,005	0,673	0,007	Gray L.R. et al. 2014 ; Wang Y. et al., 2018
Цитопротектор	0,670	0,009	0,554	0,017	Sharma A.B. et al., 2008
Противовирусный (риновирус)	0,663	0,005	0,623	0,009	Жирнов О.П., 2014
Антигипоксический	0,650	0,002	0,743	0,004	Mallet R.T. et al., 2018,
Нейропротекторный	0,648	0,05	0,646	0,066	Gray L.R. et al. 2014 ; Moro N. et al., 2016
Восстановитель	0,610	0,011	0,480	0,019	Zhang J.J. et al., 2014
Противовирусный (пикорнавирус)	0,605	0,018	0,588	0,027	Жирнов О.П., 2014
Противовоспалительный	0,600	0,004	0,614	0,026	Sharma P. et al., 2010; Mallet R.T., et al. 2018
Ингибитор адгезии тромбоцитов	0,592	0,014	0,592	0,001	
Вазопротектор	0,564	0,025	0,681	0,024	Ярцев В.Н., 2014
Иммуномодулятор	0,554	0,04	0,811	0,023	
Антинейротоксический	0,545	0,06	0,639	0,044	Sharma A.B., 2008 Rauckhorst A.J. et al., 2016
Ингибитор тромбоцитопоэза	0,519	0,004	0,854	0,006	
Антитоксический	0,516	0,012	0,599	0,006	Zhang J.J. et al., 2014
Антиишемический	0,611	0,005	0,414	0,154	Sharma A.B., 2008; Mallet R.T., 2018

Пируват и лактат, естественные биологически активные метаболиты, оказывают противовоспалительное ($P_a=0,6$ у пирувата и $P_a=0,811$ у лактата), антиишемическое ($P_a=0,611$ у пирувата и $P_a=0,414$ у лактата) действия, повышают сократительную способность сердца и энергетическое состояние миокарда, укрепляют эндогенные антиоксидантные системы и защищает ткани от ишемически-реперфузионного повреждения и окислительного стресса благодаря усилению саркоплазматического ретикулярного транспорта Ca^{2+} , увеличения продукции никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат-восстановленной формы (НАДФН) для поддержания окислительно-восстановительного состояния глутатиона [R.T. Mallet, 2018]. Пируват оказывает нейропротекторное ($P_a=0,648$) действие, предотвращая гибель клеток постишемических астроцитов, подавляя утечку лактатдегидрогеназы, уменьшая окислительно-восстановительное отношение и сдерживая активацию апоптотических событий, таких как высвобождение митохондриального цитохрома с и фрагментация каспазы-3 и PARP. Пируват может ускорять свой собственный метаболизм за счет повышения активности пируватдегидрогеназы и, таким образом, восстанавливать клеточные уровни АТФ в постишемических астроцитах [A.V. Sharma, 2008; N. Moro et al., 2016]. Благодаря этим спрогнозированным и экспериментально подтвержденным свойствам, пируват может применяться в качестве терапевтического средства для лечения инсульта ($P_a=0,73$), а также острых неврологических расстройств ($P_a=0,64$) [D. Frank et al., 2019].

Обращает на себя внимание противовирусное действие пирувата и лактата в отношении риновируса ($P_a=0,663$ у пирувата и $P_a=0,623$ у лактата), и пикорнавируса ($P_a=0,605$ у пирувата и $P_a=0,588$ у лактата). У лактата еще отмечается противовирусное влияние на арбовирусы ($P_a=0,753$), папилломмавирусы, что предположительно связано с действием естественных метаболитов на рН среды, уменьшая ее, при этом вирус теряет инфекционную активность в связи с конформационными перестройками в

структуре вируса и потерей репликационной активности [О.П. Жирнов, 2014].

Вазопротекторный эффект пирувата ($P_a=0,564$) и лактата ($P_a=0,681$), вероятно, реализуется за счет непосредственного влияния на нейрогенный тонус кровеносных сосудов [В.Н. Ярцев, 2014; Н.А. Колотьева с соавт., 2016].

Таким образом, естественные метаболиты пируват и лактат оказывают разнообразные фармакологические эффекты, влияющие на активность факторов, регулирующих межмолекулярные взаимодействия. Имеются данные об участии данных интермедиатов в различных видах обмена: липидном, белковом, углеводном.

Нами было отмечено влияние изучаемых молекул на регуляцию обмена липидов ($P_a=0,812$ пирувата и $P_a=0,784$ лактата), проявляя гипрехолестеролемический эффект ($P_a=0,757$ пирувата и $P_a=0,727$ лактата), ингибируя транс-2-еноил-КоА редуктазу ($P_a=0,812$ пирувата и $P_a=0,773$ лактата), которая участвует в биосинтезе ненасыщенных жирных кислот и в элонгации жирных кислот в митохондриях, ацилглицеролипазу ($P_a=0,855$ пирувата и $P_a=0,866$ лактата), цитохром-b5-редуктазу - десатуразу ($P_a=0,641$ пирувата и $P_a=0,548$ лактата), участвующей в образовании полиненасыщенных жирных кислот [В.В. Кржечковская, 2004]. Пируват и лактат ингибируют ферменты белкового обмена: аланинтрансаминазу, серин-3-дегидрогеназу, гамма-глутамилтрансферазу, триптофантрансаминазу. Известно действие пирувата и лактата на углеводный обмен: оказывают ингибирующее влияние на ряд ключевых ферментов, таких как L- и D- формы лактатдегидрогеназы, глицерол-3-фосфатдегидрогеназы, разных форм малатдегидрогеназы, малатоксидазы, многоферментного пируватдегидрогеназного комплекса и другие (таблица 3.2).

Таблица 3.2 – Вероятные молекулярные механизмы действия пирувата и лактата

Молекулярный механизм действия	Шифр фермента	Р _a пирувата	Р _i пирувата	Р _a лактата	Р _i лактата
Ингибитор L-лактатдегидрогеназы (цитохром)	EC 1.1.2.3	0,778	0,001	-	-
Ингибитор D-лактатдегидрогеназы (цитохром)	EC 1.1.2.4	0,765	0,001	0,783	0,002
Ингибитор глицерол-3-фосфатдегидрогеназы	EC 1.1.1.8	0,669	0,003	0,698	0,003
Ингибитор глицерол-3-фосфатоксидазы	EC 1.1.3.21	0,705	0,002	0,616	0,004
Ингибитор малатдегидрогеназы	EC 1.1.1.37	0,674	0,005	0,705	0,004
Ингибитор акцептора малатдегидрогеназы	EC 1.1.1.37	0,62	0,011	0,594	0,018
Ингибитор НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы (декарбоксилирующей оксалоацетат)	EC 1.1.1.40	0,529	0,003	0,5	0,003
Ингибитор НАДФ-зависимой декарбоксилирующей малатдегидрогеназы	EC 1.1.1.82	0,471	0,002	0,522	0,003
Ингибитор D-малат декарбоксилирующей дегидрогеназы	EC 1.1.1.83	0,557	0,003	0,723	0,002
Ингибитор лактат-малат трансгидрогеназы	EC 1.1.99.7	0,524	0,001	0,808	0,001
Ингибитор малатоксидазы	EC 1.1.3.3	0,567	0,008	0,522	0,016
Ингибитор оксалоацетат таутомеразы	EC 5.3.2.2	0,723	0,001	0,881	0,001
Ингибитор оксалоацетат декарбоксилазы	EC 4.1.1.3.	0,674	0,002	0,742	0,003
Ингибитор фосфоенолпируват протеинфосфотрансферазы	EC 2.7.3.9	0,91	0,001	0,922	0,001
Ингибитор пируватдекарбоксилазы	EC 4.1.1.1	0,887	0,002	0,938	0,001
Ингибитор пируватдегидрогеназы (липоамид)		0,857	0,002	0,892	0,002
Ингибитор пируватдегидрогеназы (цитохрома)	EC 1.2.2.2	0,812	0,002	0,59	0,005
Ингибитор пируватдегидрогеназы	EC 1.2.4.1.	0,799	0,002	0,856	0,002
Ингибитор фосфоенолпируваткарбоксикиназы (дифосфат)	EC 4.1.1.38	0,769	0,002	0,8	0,002
Ингибитор фенилпируватдекарбоксилазы	EC 4.1.1.43	0,808	0,002	0,614	0,004
Ингибитор глутами-фенилпируваттрансаминазы	EC 2.6.1.64	0,83	0,004	0,807	0,005
Ингибитор аспартат-фенилпируваттрансаминазы	EC 2.6.1.70	0,854	0,003	0,816	0,004

Обращает на себя внимание влияние естественных интермедиатов на экспрессию генов (таблица 3.3). Пируват ($P_a=0,549$) и лактат ($P_a=0,553$) усиливают экспрессию гена HMOX1, кодирующего стресс-индуцированный белок гемоксигеназу-1, который регулирует жизнеспособность, пролиферацию и дифференцировку многих типов клеток. Терапия пируватом в исследовании Zager R.A. (2014) вызывала увеличение цитопротективной мРНК оксигеназы 1 и IL-10, избирательному снижению провоспалительных мРНК (например, MCP-1 и TNF- α) и улучшению уровней АТФ в ткани. Пируват непосредственно ослабляет активную секрецию белка амфотерина (HMGB1) в проксимальных трубчатых клетках путем индукции гемоксигеназы-1 посредством активации пути фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) / протеинкиназа (Akt) и ядерного фактора 2 (Nrf2) [M.S. Seo et al., 2019].

Интересным представляется тот факт, что пируват ($P_a=0,676$) и лактат ($P_a=0,507$) усиливают экспрессию гена TP53 – транскрипционного фактора, регулирующего клеточный цикл. Белок p53 выполняет функцию супрессора образования злокачественных опухолей, благодаря этому ген TP53 является антионкогеном [V.A. Chavez-Perez et al., 2011].

Предсказано ингибирующее влияние пирувата ($P_a=0,606$) на экспрессию гена MMP9 (белок семейства матриксных металлопротеиназ). Введение этилпирувата в клеточную культуру немелкоклеточного рака легких снижает уровень экспрессии гена PCNA и MMP9 и повышает уровень белка P53, что приводит к ингибированию роста клеток немелкоклеточного рака легких, инвазию и миграцию и индуцирует апоптоз [Q. Liu et al., 2019]. Помимо этого, предсказано, что пируват уменьшает экспрессию гена TNF ($P_a=0,589$) (фактор некроза опухоли). Этот ген кодирует многофункциональный провоспалительный цитокин, который в основном секретируется макрофагами, участвует в регуляции пролиферации клеток, дифференцировки, апоптоза, метаболизма липидов и коагуляции. Пируват

оказывает смягчающее воздействие на различные реакции системного воспаления, в том числе значительно снизил инфильтрацию легочного воспаления при радиационно-индуцированной травме легких, наряду со снижением уровня провоспалительных факторов IL-1 β , IL-6, TNF- α , GM-CSF, M-CSF, TGF- β 1 и HMGB1 [R.A. Zager et al., 2014; В. Chen et al., 2017].

Таблица 3.3 – Влияние малых молекул пирувата и лактата на экспрессию генов

Влияние на экспрессию генов	P_a пирувата	P_i пирувата	P_a лактата	P_i лактата
Усилитель экспрессии гена гемоксигеназы HMOX1	0,549	0,027	0,553	0,017
Усилитель экспрессии гена TP53 (белок p53)	0,676	0,031	0,507	0,022
Ингибитор экспрессии гена MMP9 (семейство матриксных металлопротеиназ)	0,606	0,015	0,15	0,065
Ингибитор экспрессии гена TNF (фактор некроза опухоли)	0,589	0,014	0,163	0,084
Ингибитор экспрессии гена EIF4E (эукариотический фактор инициации трансляции 4E)	0,544	0,005	0,015	0,005
Ингибитор экспрессии гена BRAF (белок, B-Raf (протоонкоген))	0,724	0,003	-	-
Ингибитор экспрессии гена TERT (теломеразная обратная транскриптаза)	-	-	0,621	0,016

Спрогнозировано компьютерной программой PASS ингибиторное действие пирувата на экспрессию гена EIF4E (эукариотический фактор инициации трансляции 4E) ($P_a=0,544$), его активация связана с трансформацией и опухолеобразованием. Пируват ингибирует экспрессию гена BRAF ($P_a=0,724$). Белок B-Raf – протоонкоген, является частью сигнального пути RAS/MAPK, который регулирует рост, пролиферацию, дифференцировку, миграцию и апоптоз клеток [T. Delgado-Goni et al., 2016]. Предсказано, что лактат ингибирует экспрессию гена TERT ($P_a=0,621$) -

теломеразная обратная транскриптаза, которая является каталитической субъединицей фермента теломеразы. Ген TERT проявляет свою активность в основном в прогениторных и раковых клетках, в меньшей степени – в соматических клетках и играет важную роль в старении и антиапоптозе.

Таким образом, анализируя полученные данные с помощью компьютерной среды PASS обращает на себя внимание проявление разнообразных эффектов пируватом и лактатом. Среди них регуляция липидного, белкового, углеводного обменов, созревание клеток, влияние на экспрессию генов, возможность оказывать антигипоксическое, антиишемическое, антитоксическое, антинейротоксическое, иммуномодулирующее, противовоспалительное, противовирусное, вазопротекторное и цитопротекторное действия [Н.А. Колотьева с соавт., 2016]. Отмечается использование природного естественного метаболита в качестве терапевтического средства для лечения различных заболеваний, таких как ишемический инсульт и острые неврологические расстройства. Проявление этих эффектов, вероятно, реализуется через конформационную перестройку рецепторов и активных центров связывания, изменение активности ферментов, а также синтеза биологически активных промежуточных соединений, что проявляется в регулировании баланса межмолекулярных сигнальных путей и экспрессии генов. Учитывая большое количество проявляемых фармакологических эффектов и молекулярных механизмов, следующим этапом стала оценка вероятных партнеров взаимодействия для изучаемых малых молекул.

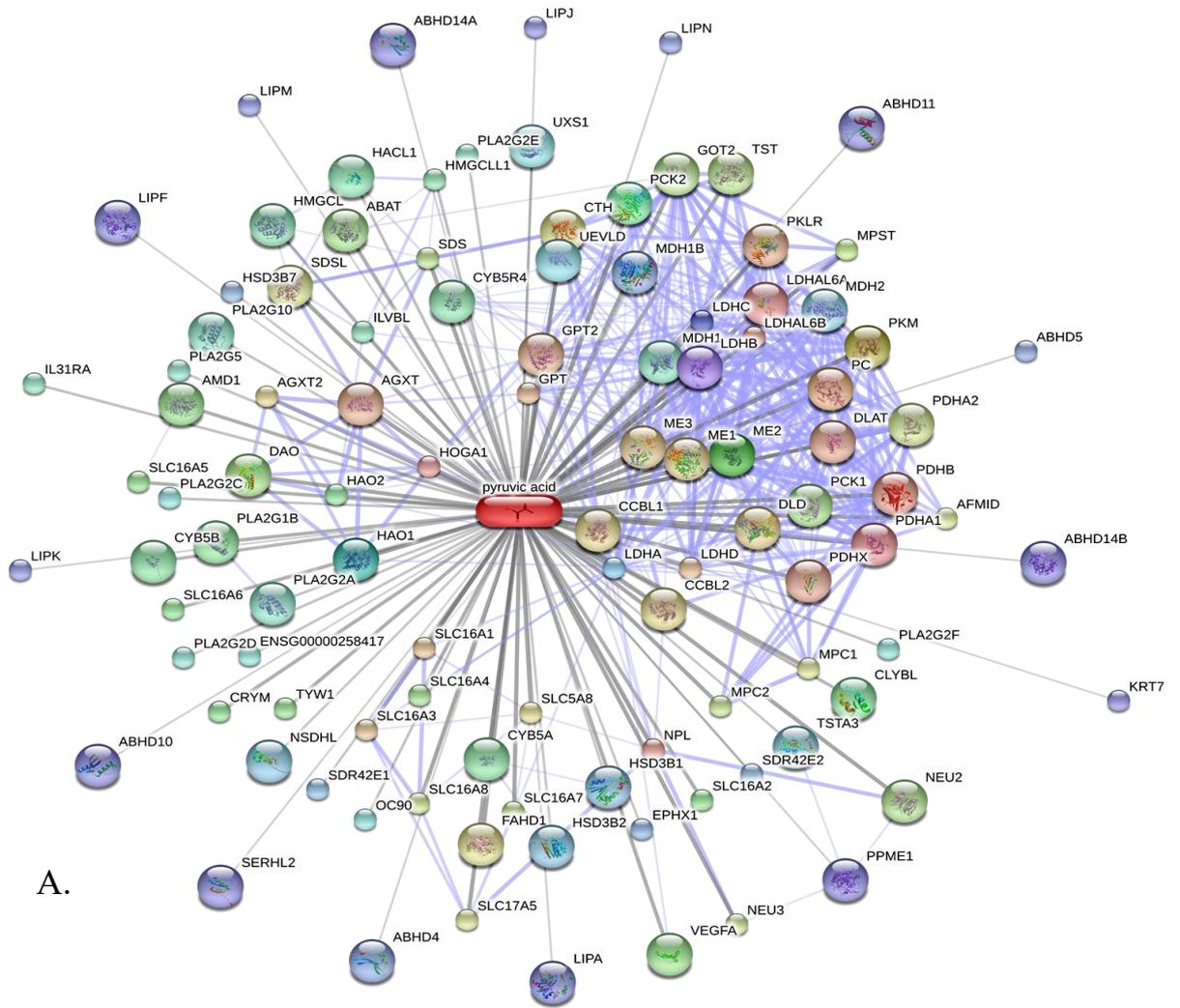
3.1.2. Оценка вероятных белков-партнеров для пирувата и лактата в среде STITCH

Межмолекулярные взаимодействия между белками и малыми молекулами являются неотъемлемой частью биологических процессов в организме. Информация об этих взаимодействиях разбросана по многим базам данных, что затрудняет получение комплексного обзора имеющихся

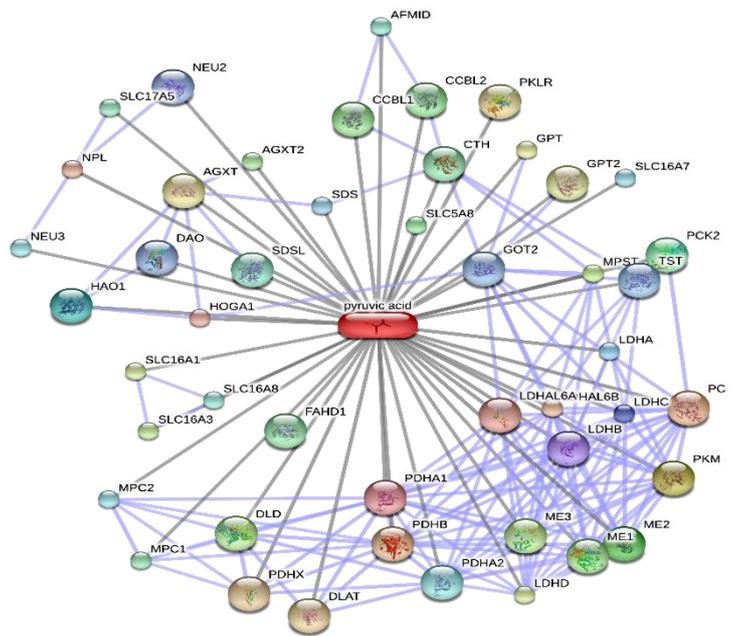
сведений. Для решения этой проблемы мы использовали программу STITCH версии 5.0. (Search Tool for Interacting Chemicals) - поисковый инструмент для взаимодействующих химических веществ, который объединяет в себе разрозненные источники данных по 430 000 веществам в единый, простой в использовании ресурс, что позволяет быстро получить обзор потенциального воздействия химического вещества с партнерами по взаимодействию. STITCH включает более 9 600 000 белков из 2031 эукариотического и прокариотического геномов [D. Szklarczyk et al., 2016]. Благодаря имеющимся в базе данных сведениям из таких библиотек как Drug Bank, GLIDA, Matador и другие, производится компьютерное прогнозирование с использованием алгоритма математического подсчета константы ингибирования вещества. Результат отображается в виде построения сети взаимодействия исследуемого соединения с межмолекулярными партнерами и может быть настроен по степени доказательности, уверенности, молекулярному действию, аффинитету связи, последний вариант настройки мы использовали в своей работе. Порог достоверности может быть настроен от 0 до 1: низкий $p > 0,1$, средний $p > 0,4$, высокий $p > 0,7$, наивысший $p > 0,9$.

Нами был осуществлен поиск межмолекулярных партнеров для пирувата и лактата. При использовании среднего порога достоверности $p > 0,4$ количество взаимодействий для пирувата составило 109, для лактата 384.

Отмечаются взаимодействия исследуемых малых молекул с рецепторами, белками-переносчиками, гормонами, ферментами, на основании которых были построены молекулярные модели (рисунок 3.2, 3.3). В таблице 3.4 предсказаны в компьютерной среде STITCH с высокой степенью достоверности общие для пирувата и лактата белки-партнеры. Известным является факт взаимодействия пирувата и лактата в качестве субстратов с ферментом лактатдегидрогеназой и ее различными изоформами.



A.



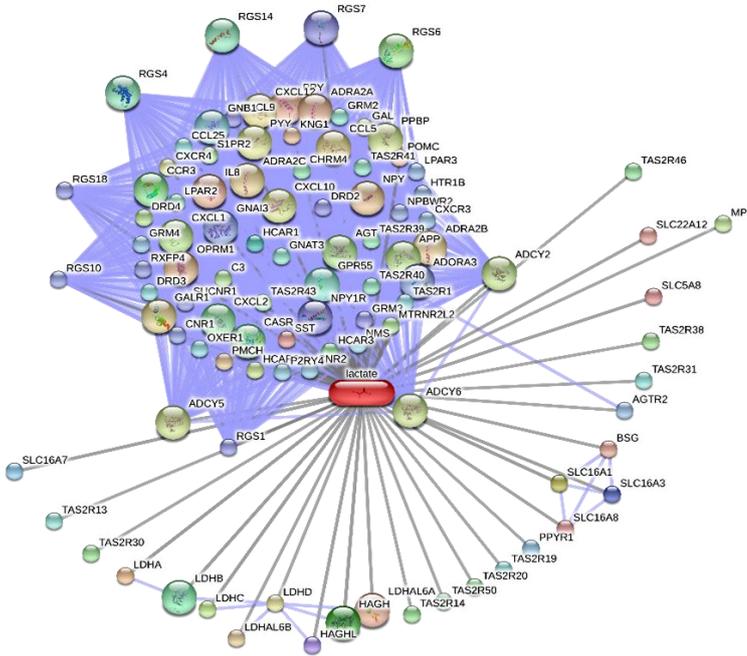
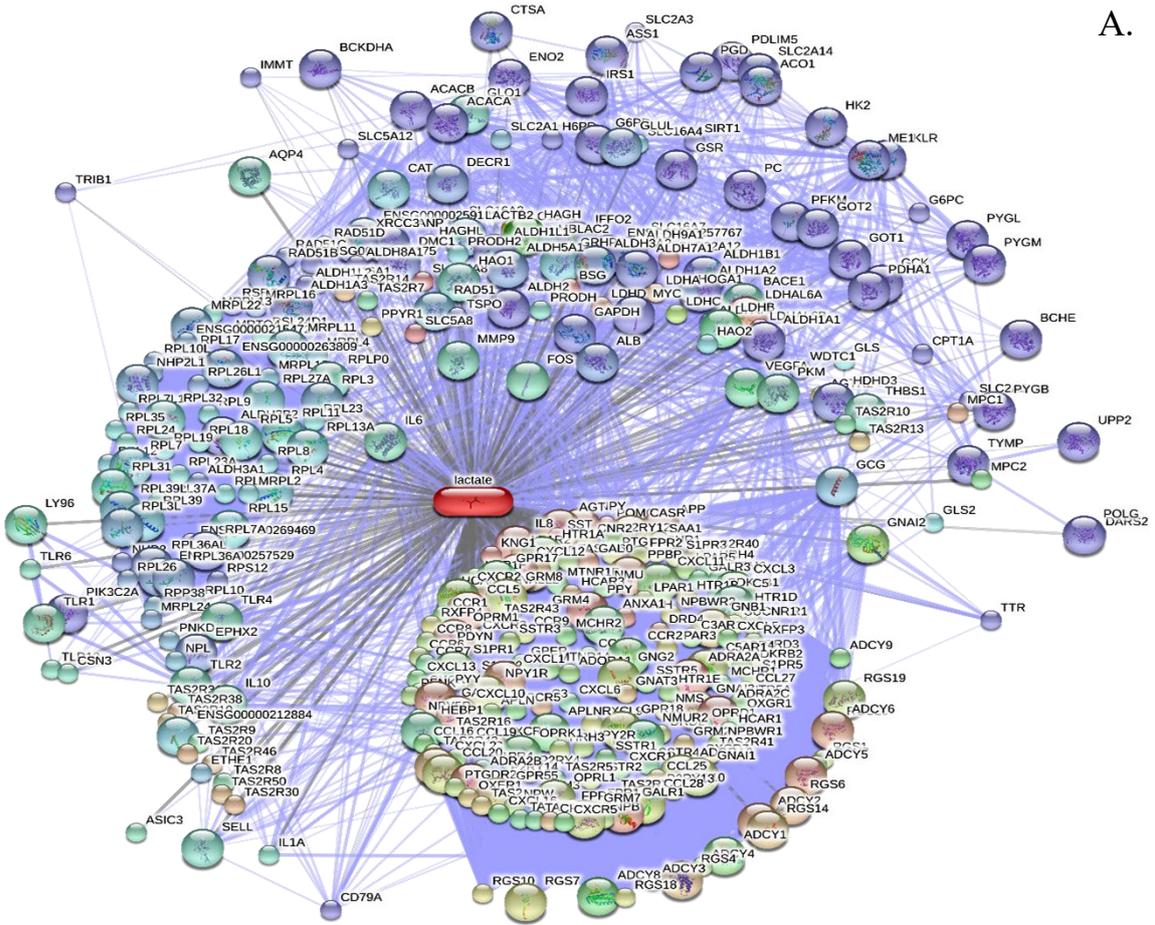
Б.

Рисунок 3.2 – Молекулярная модель взаимодействия пирувата с партнерами.

А. Степень достоверности средняя $p > 0,4$.

Б. Степень достоверности наивысшая $p > 0,9$

A.



Б.

Рисунок 3.3 – Молекулярная модель взаимодействия лактата с партнерами.

А. Степень достоверности средняя $p > 0,4$.

Б. Степень достоверности наивысшая $p > 0,9$

Предсказана вероятность пирувата ($p = 0,985$) и лактата ($p = 0,898$) связываться с каталитическим белком пируваткиназой, которая стимулирует POU5F1-опосредованную активацию транскрипции и играет общую роль в каспазо-независимой гибели опухолевых клеток. Соотношение между высокоактивной тетрамерной формой и почти неактивной димерной формой пируваткиназы определяет, будет ли углерод глюкозы направляться в процессы биосинтеза или использоваться для производства гликолитического АТФ. Переход между двумя формами способствует контролю гликолиза и важен для пролиферации и выживания опухолевых клеток [W. Luo et al., 2011].

Пируват и лактат с одинаково высокой степенью вероятности вступает во взаимодействие с белками транспортных систем: семейством транспортёров растворённых веществ (Solute Carrier Family - SLC16, SLC5), митохондриальным переносчиком пирувата (MPC) 1 и 2 типов (таблица 3.4). Перечисленные транспортные системы осуществляют быстрый транспорт через плазматическую мембрану многих монокарбоксилатов, таких как лактат, пируват, оксокислоты с разветвленной цепью, полученные из лейцина, валина и изолейцина, и кетонных тел (ацетоацетат, бета-гидроксibuтират и ацетат). Йодистый транспортер выступает в качестве электрогенного натриевого и хлорид-зависимого переносчика растворенных веществ [A.P. Halestrap, 2012].

Изучаемые естественные интермедиаты пируват ($p = 0,814$) и лактат ($p = 0,879$) с высокой степенью вероятности выступают лигандом для эндотелиального сосудистого фактора (VEGF). В работе J. Song с коллегами (2018) показано, что лактат усиливает экспрессию VEGF в макрофагах и способствует хориоидальной неоваскуляризации и активации процесса макрофагального ангиогенеза.

Таблица 3.4 – Спрогнозированные белки – партнеры взаимодействия с пируватом и лактатом

Белок	Описание	Пируват	Лактат
LDHA	L-лактатдегидрогеназа цепь А изоформа 3(локус 361 aa)	0,969	0,998
LDHC	L-лактатдегидрогеназа цепь С; (локус 332 aa)	0,968	0,990
LDHB	L-лактатдегидрогеназа цепь В (локус 334 aa)	0,968	0,986
LDHD	Лактатдегидрогеназа D (локус 507 aa)	0,910	0,911
LDHAL6A	Лактатдегидрогеназа А типа 6А; (локус 332 aa)	0,960	0,929
LDHAL6B	Лактатдегидрогеназа А типа 6В (локус 381 aa)	0,957	0,915
PKM	Пируваткиназа мышечная (локус 531 aa)	0,985	0,898
HAO1	Гидроксикислота оксидаза (гликолатоксидаза) 1; (локус 370 aa)	0,973	0,717
SLC16A1 участник 1	Семейство транспортёров растворённых веществ 16; Протон-связанные монокарбоксилатные транспортеры	0,909	0,994
SLC16A3 участник 3		0,909	0,969
SLC16A7 участник 7		0,900	0,969
SLC5A8 участник 8	Семейство транспортёров растворённых веществ 5; йодистый транспортер	0,900	0,954
MPC1	Митохондриальный переносчик пирувата 1; (локус 109 aa)	0,900	0,908
MPC2	Митохондриальный переносчик пирувата 2; (локус 127 aa)	0,900	0,900
VEGFA	сосудистый эндотелиальный фактор роста А (локус 412 aa)	0,814	0,879

Как было предсказано программой PASS и общеизвестным является факт взаимосвязи пирувата с такими белками как: пируваткарбоксилаза (р 0,994); фосфоенолпируваткарбоксикиназа 2 (митохондриальная) (р 0,975);

пируватдегидрогеназа (липоамид) альфа 1 (p 0,961); пируватдегидрогеназа (липоамид) бета (p 0,949) - связывающая гликолитический путь с трикарбонным циклом; комплекс пируватдегидрогеназы, компонент X (p 0,942), требующийся для прикрепления дигидролипоамиддегидрогеназы (p 0,975) к ядру дигидролипоамидтрансацилазы (p 0,975) пируватдегидрогеназных комплексов эукариот. Спрогнозировано содействие пирувата с различными изоформами яблочного фермента: цитозольной НАДФ(+)-зависимой изоформы (ME1) (p 0,908), митохондриальной НАДФ(+)-зависимой изоформы (ME3) (p 0,908) и митохондриальной НАД(+)-зависимой изоформы (ME2) (p 0,979), а также глицерол-3-фосфатдегидрогеназой (p 0,777). Интересными являются данными о взаимосвязи пирувата с фосфолипазой A2 (p 0,794), которая катализирует кальций-зависимый гидролиз 2-ацильных групп в 3-sn-фосфоглицеридах, при этом высвобождаются глицерофосфолипиды и арахидоновая кислота, служащие предшественниками сигнальных молекул.

Ряд спрогнозированных молекулярных взаимодействий с высокой степенью вероятности в настоящее время малоизученны. Предсказана возможность пирувата являться лигандом цистатион гамма-лиазы (p 0,9), которая катализирует последний этап транс-сульфидирования от метионина к цистеину; меркаптопируват сульфуртрансфераза (p 0,979), осуществляющей детоксификацию цианида и биосинтез тиосульфатов. Оба эти белка генерируют эндогенную молекулу сероводорода (H₂S), являющейся синаптическим модулятором, сигнальной молекулой, гладкомышечным подрядчиком и нейропротектором, регулятором артериального давления [M.M. Kuo et al., 2016].

Пируват способен вступать во взаимодействие с цитохромом b₅, представляющим собой мембраносвязанный гемопротеин, который функционирует в качестве переносчика электронов для нескольких мембраносвязанных оксигеназ.

Интересными являются данные о взаимосвязи лактата со многими рецепторами, в числе которых рецепторы гидроксикарбоновой кислоты HCAR1 (p 0,986), HCAR2 (p 0,908), HCAR3 (p 0,900), проявляющие свои эффекты с использованием G-белок опосредованного пути. Кроме этого, смоделировано, что лактат может взаимодействовать с альфа-2 адренергическими рецепторами ADRA2A (p 0,922), ADRA2B (p 0,914), ADRA2C (p 0,914), опосредующими катехоламиновое ингибирование аденилатциклазы под действием G-белков. С высокой степенью вероятности изучаемый интермедиат вступает во взаимодействие с опиоидными (p 0,917), дофаминовыми (p 0,907), мускариновыми холинэргическими (p 0,900), брадикининовыми (p 0,900), глутаматными (p, 0,900), рецепторами лизофосфатидной кислоты (p 0,900), G-белок-связанным рецептором (p 0,900), что говорит об участии лактата в передаче нервного импульса и выполнении неметаболических функций в центральной нервной системе, связанных с семейством гетеромерных G-белков, роли трансмиттера и медиатора разнообразных клеточных процессов [F. Tang et al., 2014]. Спрогнозирована роль лактата как нейропротекторного фактора (p 0,900). Механизм действия интермедиата связан с белком MTRNR2, который уменьшает продукцию бета-амилоидного пептида при болезни Альцгеймера [M. Zhang et al., 2018]. Стоит отметить спрогнозированную функцию лактата выступать лигандом для таких нейромедиаторов как глутамат (p 0,985), дофамин (p 0,954), ацетилхолин (p 0,948), гистамин (p 0,946), простагландин E2 (p 0,944). Таким образом, спрогнозирована и экспериментально доказана не только метаболическая роль лактата в уменьшении развития нейродегенеративных процессов, но и с открытием специфического рецептора, теперь, вероятно, лактат рассматривается как своего рода медиатор или даже гормон, участвующий в таких сложных процессах, как формирование памяти и нейропротекция [P. Proia et al., 2016].

Нами была отмечена высокая вероятность взаимодействия лактата с такими гормонами как адреналин (р 0,985), соматостатин (р 0,936), мелатонин (р 0,929), полипептид поджелудочной железы (р 0,927), промеланин-концентрирующий гормон (р 0,915), который может действовать как нейротрансмиттер или нейромодулятор в широком спектре нейрональных функций. Также лактат может взаимодействовать с гормоноподобными структурами по рецептор-опосредованному механизму: с оксоейкозаноидными (р 0,900) рецепторами, 5-гидрокситриптаминавыми (серотониновыми) рецепторами (р 0,900), рецепторами гормона галанин (р 0,913) и рецепторами простагландина Е (р 0,900).

Обращает на себя внимание высокая способность лактата и пирувата воздействовать на иммунологические и воспалительные процессы, как и было предсказано выше компьютерным обеспечением PASS, но с использованием других механизмов действия. Изучаемая малая молекула лактат связывается с интерлейкином 8 (р 0,924), интерлейкином 6 (р 0,865) - мощным индуктором острой фазы, участвующим в окончательной дифференцировке В-клеток, лимфоцитов и моноцитов; интерлейкином 10 (р 0,851), ингибирующим синтез цитокинов (гамма-интерферон, IL-2, IL-3, TNF и GM-CSF); интерлейкином 1 альфа (р 0,748), участвующим в воспалительном ответе и стимулирующим высвобождение простагландина и коллагеназы из синовиальных клеток. Пируват, в свою очередь, выступает лигандом для рецептора интерлейкина 31 (р 0,618).

Отмечена вероятность лактата являться партнером взаимодействия для различных групп хемокинов. Так хемокин CCL5 (р 0,911) является хемоаттрактантом для моноцитов крови, Т-хелперов памяти и эозинофилов, вызывает выброс гистамина из базофилов и активирует эозинофилы. Связываясь с хемокинами CCR1, CCR3, CCR4 и CCR5, является одним из основных ВИЧ-супрессивных факторов, продуцируемых CD8⁺ Т-клетками. Хемокин CXCL1 (р 0,908) обладает хемотаксической активностью для

нейтрофилов и может играть роль в воспалении, оказывая свое влияние на эндотелиальные клетки аутокринным способом. В работе Zhang D. (2019) с коллегами показано, что лактирование остатков лизина гистона, служит эпигенетической модификацией, которая непосредственно стимулирует транскрипцию генов из хроматина макрофагов и способствует их гомеостазу. Таким образом, лактирование гистонов представляет собой возможность улучшить понимание функций лактата и его роли в различных патофизиологических состояниях, включая инфекцию и рак [D. Zhang et al., 2019].

Проведенное изучение 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 малых молекул пирувата и лактата. Изучаемые естественные интермедиаты являются промежуточными соединениями метаболизма и принимают участие в белковом, липидном и углеводном обменах, выполняют координационную роль в функционировании и модулировании медиаторного, гормонального, рецепторного ответов, иммунологических, воспалительных, антибактериальных и противовирусных реакций, обладают антиканцерогенным действием. Несомненный интерес представляет дальнейшее исследование пирувата и лактата с использованием методов молекулярного зондирования белок-белковых взаимодействий. Одной из задач для нас было поиск молекулярной модели в связи с трудноосуществимым изучением функциональной роли малых молекул на выделенном фрагменте метаболома человека. Антигены АВ0 системы человека, локализованные на мембране эритроцита, являются доступными для анализа и количественной оценки, а взаимодействие антигенов с антителами является одной из разновидностей белок-белкового взаимодействия. Далее мы проводили эксперименты с использованием

гликопротеинов А и В и естественных иммуноглобулинов пируватом и лактатом *in vitro*.

3.2. Исследование белок-белкового взаимодействия на модели гликопротеинов групп крови АВ0 системы

Белок-белковое взаимодействие – неотъемлемая часть межмолекулярной коммуникации. Гистогруппа крови АВ0, основная система аллоантигенов человека, включает три углеводных антигена А, В, Н. У индивидуумов с группами крови А(II), В(III) и АВ(IV) проявляют активность гликозилтрансферазы, превращая предшественник антиген Н в антигены А или В, тогда как индивидуумы с антигеном Н группы крови 0(I) не обладают такой активностью. Система АВ0 состоит из групповых антигенов, презентированных на мембране эритроцитов и естественных антител, представленных иммуноглобулинами класса М в плазме. Углеводные компоненты А, В имеют различное строение: терминантной субъединицей гликопротеина А является гликан N-ацетилгалактозамин - α GalNAc, гликопротеина В – гликан D-галактоза - α Gal. [Ф.Н. Гильмиярова с соавт., 2013; E. Cid et al., 2019].

Нами был проведен ряд экспериментов по взаимодействию гликопротеинов А и В, естественных антител агглютининов α и β метаболитами пируватом и лактатом. Оценивали время наступления в секундах и интенсивность взаимодействия антитела с гликопротеином по шкале Марша от 1 до 12 в рт. Конечная концентрация малых молекул пирувата и лактата при инкубации с антигенами А и В и естественными анти-А и анти-В антителами подбирались эмпирическим способом, учитывая оценку рН среды и физиологические значения содержания исследуемых метаболитов *in vivo* и составила 2 мМ. Показатели рН инкубационной среды составили: контроль – $7,12 \pm 0,02$ при добавлении пирувата – $7,10 \pm 0,03$; при

добавлении лактата – $7,09 \pm 0,03$, что находится в пределах контрольных величин.

Сначала оценили влияние малых молекул на группоспецифичные белки эритроцитов А(II), В(III), АВ(IV) групп крови.

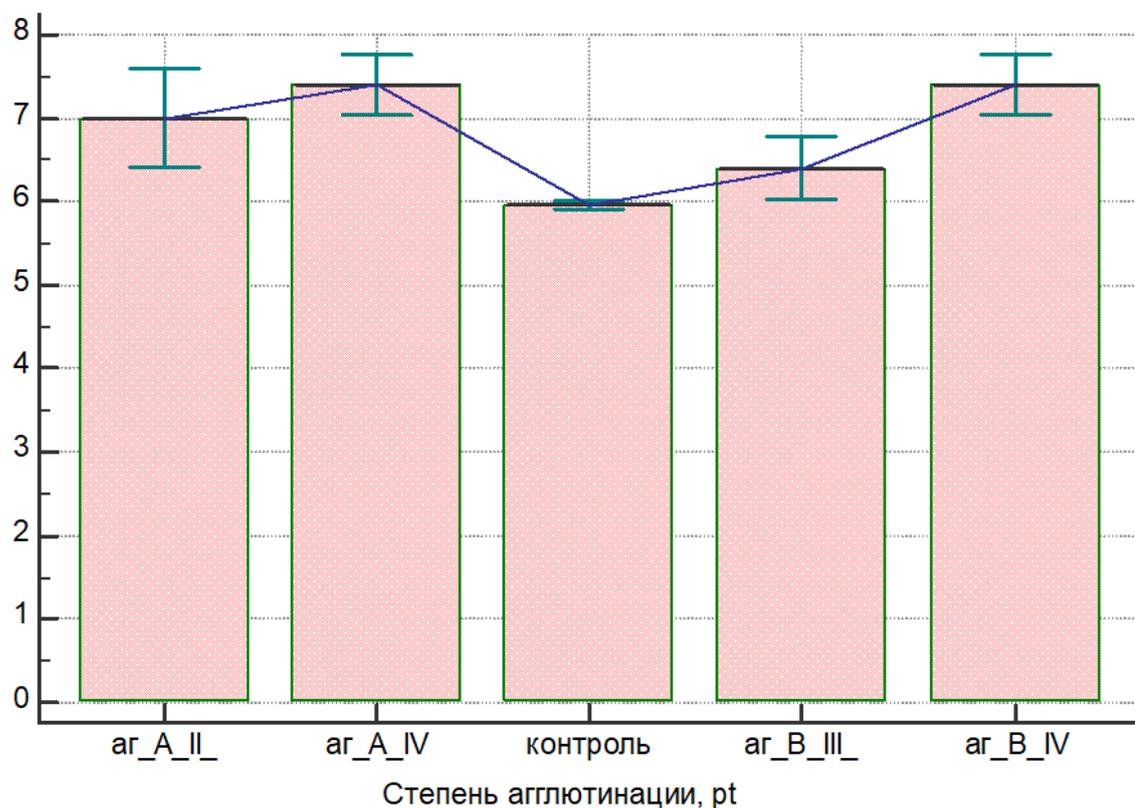


Рисунок 3.4 – Влияние пирувата на степень агглютинации гликопротеинов А и В

При инкубации пирувата с углеводными компонентами эритроцитов в модельном эксперименте отмечается удлинение времени наступления агглютинации гликопротеина А А(II) на 16% ($p < 0,001$), гликопротеина А АВ(IV) ($p < 0,0001$) и гликопротеина В АВ(IV) ($p < 0,0001$) на 23% в отличие от контролей (рисунок 3.4); эксперимент с гликопротеином В В(III) ($p < 0,05$) незначительно изменился, время увеличилось на 6% по сравнению с контрольным. При оценке степени выраженности взаимодействия белковых структур отмечается максимальное значение в эксперименте с гликопротеинами А А(II) и гликопротеинами В В(III), как и в контрольном –

12 pt. Гликопротеины А и В эритроцитов АВ(IV) ($p < 0,05$) группы были оценены на 10% меньшей степенью выраженности взаимодействия и составила 10,8 pt по сравнению с контрольными цифрами.

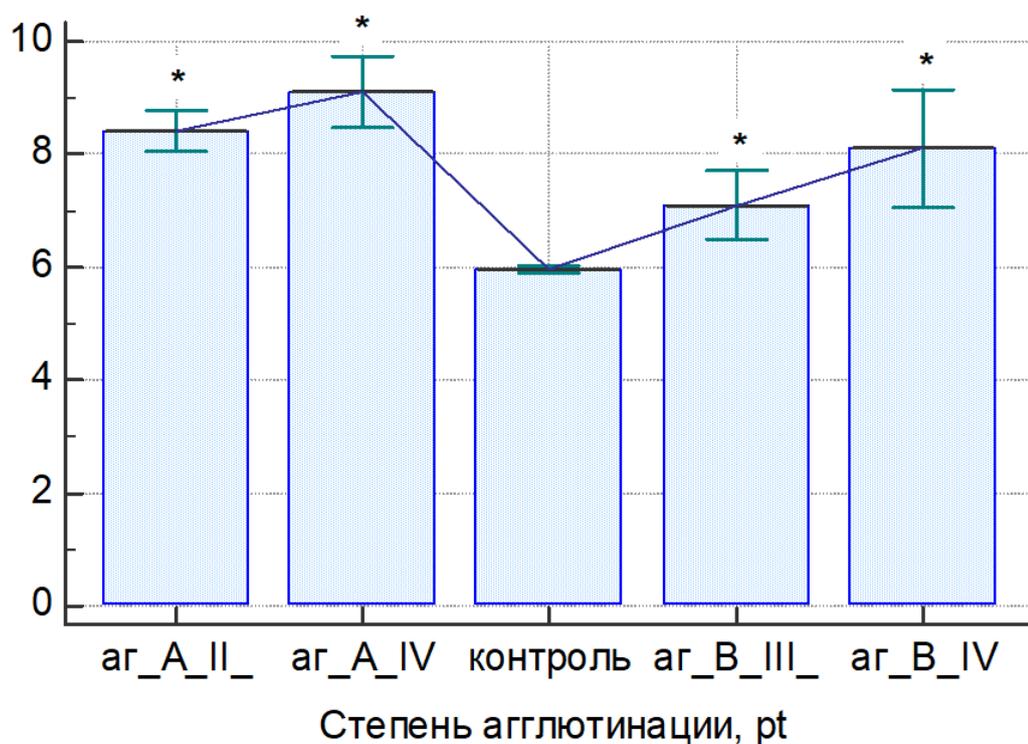


Рисунок 3.5 – Влияние лактата на степень агглютинации гликопротеинов А и В

При добавлении лактата в экспериментальную среду отмечается также увеличение скорости образования белок-белковых комплексов, как и в опыте с пируватом (рисунок 3.5). Время агглютинации зондированного лактатом гликопротеина А А(II) удлинилось на 40% ($p < 0,001$), гликопротеина В В(III) ($p < 0,05$) на 18% от контрольных значений, гликопротеина А АВ(IV) ($p < 0,0001$) составила максимальное значение – время образования комплексов увеличилось на 51,6%, гликопротеина В АВ(IV) ($p < 0,01$) удлинилось на 35%. Степень интенсивности взаимодействия белковых компонентов была максимальной и составила 12 pt, а в эксперименте с гликопротеином А и В АВ(IV) ($p < 0,05$) снизилась на 8,4%.

Полученные экспериментальные данные по оценке влияния биологически активными соединениями изучаемых антигенных детерминант системы АВ0 с учетом времени наступления образования белковых комплексов и степени интенсивности их взаимодействия представлены в таблицах 3.5, 3.6 и 3.7.

Таблица 3.5 – Степень интенсивности взаимодействия группоспецифичных белков с агглютинидами при внесении малых молекул, рт.

n=20	Пируват	Лактат
	Mean ± m	Mean ± m
Гликопротеин А		
Контроль гликопротеин А группы крови А(II)	12±0,01	12±0,01
Гликопротеин А группы крови А(II)	12±0,01	12±0,01
Контроль гликопротеин А группы крови АВ(IV)	12±0,01	12±0,01
Гликопротеин А группы крови АВ(IV)	10,8±0,25*	11±0,09*
Гликопротеин В		
Контроль гликопротеин В группы крови В(III)	12±0,01	12±0,01
Гликопротеин В группы крови В(III)	12±0,01	12±0,01
Контроль гликопротеин В группы крови В(IV)	12±0,01	12±0,01
Гликопротеин В группы крови АВ(IV)	10,8±0,19*	11±0,09*

* p<0,05

Условные обозначения: Mean ± m – среднее арифметическое значение и ошибка среднего, p – уровень значимости между контролем.

Таблица 3.6 – 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) лак - А(II) пир p=0,0002 А(IV) лак - А(IV) пир 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) лак - В(III) пир p=0,04 В(IV) лак - В(IV) пир p=0,009	

[#] p<0,0001

* p<0,001

^{##} p<0,01

** p<0,05

Полученные результаты свидетельствуют о том, что выявленные однонаправленные различия во времени образования белок-белковых комплексов и степени интенсивности их взаимодействия по сравнению с контролем и в межгрупповых, вероятно, связаны со структурным отличием строения углеводных детерминант гликопротеинов А и В. Разные гликаны на конце олигосахаридной цепочки составляют отличительные характеристики строения антигенов [К. Saliminejad et al., 2018]. Показано, что малые молекулы пируват и лактат в большей степени изменяют время образования комплексов гликопротеина А, вследствие чего имеют большее сродство к эпитопу А – N-ацетилгалактозамину (α GalNAc), чем D-галактозе гликопротеина В (α Gal). С одинаковой степенью интенсивности на введение пирувата и лактата реагируют эпитопы α GalNAc АВ(IV) и α Gal АВ(IV), что вероятно связано с особенностью строения эритроцитов АВ(IV) группы крови – наличием двух антигенных детерминант и их межмолекулярным взаимодействием с малыми молекулами. Обращает на себя внимание, что лактат во всех сериях экспериментов проявляет себя с большей биологической активностью, в отличие от пирувата, удлинняя время вступления во взаимодействие белковых структур и изменяя качество образованных комплексов, с большей степенью достоверности с углеводными компонентами N-ацетилгалактозамина А(II) и АВ(IV) групп, что подтверждается высокой степенью значимости межгруппового сравнения (таблица 3.6).

Следующим этапом было изучение влияния интермедиатов пирувата и лактата на естественные антитела АВ0 системы (таблица 3.7).

Показано, что естественные антитела по-разному отвечают на воздействие биологически активными метаболитами. После инкубации с пируватом степень интенсивности взаимодействия агглютинина α со стандартными эритроцитами была одинаковой с контрольным значением, а степень агглютинации агглютинина β ($p < 0,05$) увеличилась на 25%. Таким

образом, следует отметить, что агглютинин β отвечает на влияние пируватом, а агглютинин α стабилен. Выявлено уменьшение интенсивности взаимодействия естественных антител со стандартными эритроцитами при внесении в экспериментальную среду лактата. Степень взаимодействия обоих агглютининов снизилась по сравнению с показателем контроля, агглютинина α ($p < 0,05$) на 40%, агглютинина β ($p < 0,05$) на 55%. Выявлено, что лактат в большей степени может оказывать влияние на групповые иммуноглобулины, вызывая их модификацию и уменьшая способность образовывать комплексы со специфичными антигенными детерминантами, то есть уменьшает их аффинность. Полученные результаты показывают, что агглютинины β подвержены более сильному влиянию как пирувата, так и лактата, что проявляется в разнонаправленном изменении степени агглютинации, что вероятно связано с их большей конформационной перестройкой, в отличие от агглютининов α .

Таблица 3.7 – Степень интенсивности взаимодействия агглютининов α и β под влиянием малых молекул, pt.

n=20	Пируват	Лактат
	Mean \pm m	Mean \pm m
Контроль агглютинин α	10 \pm 0,001	10 \pm 0,001
Агглютинин α	10 \pm 0,001	6 \pm 0,28*
Контроль агглютинин β	8 \pm 0,23	9 \pm 0,23
Агглютинин β	10 \pm α 0,001*	4 \pm 0,43*

* $p < 0,05$

Условные обозначения: Mean \pm m – среднее арифметическое значение и ошибка среднего, p – уровень значимости между контролем и опытом.

Таким образом, естественные интермедиаты, высокоактивные биологические соединения пируват и лактат изменяют сродство углеводов

компонентов антигенов к антигенсвязывающим сайтам естественных антител, что приводит через модуляцию их конформации к изменению специфичности белок-белкового взаимодействия и их микроокружения, связанного с построением межмолекулярных связей углеводных компонентов гликопротеинов с малыми молекулами.

Существует ряд исследований, посвященных изучению взаимосвязи между инфекционными, соматическими и онкологическими заболеваниями и групповой принадлежностью крови, в которых авторы указывают на важную роль гликанов в качестве молекул распознавания [Ф.Н. Гильмиярова с соавт., 2012; 2013; 2020; I.A. Selezneva et al., 2017; И.А. Селезнева с соавт., 2019; В.И. Кузьмичева с соавт., 2019]. В работе Valverde P. с коллегами по изучению межмолекулярного взаимодействия групп крови системы АВО показано, что гликановая детерминанта α GalNAc A(II) группы крови на молекулярном уровне имеет ключевое значение в различных иммунологических событиях, связанных от рака до аллергии, в то время как эпитоп α Gal B(III) группы показывает слабое взаимодействие [P. Valverde et al., 2019]. Выявлено, что наибольшее количество лиц с онкологическими заболеваниями имеют А(II) и АВ(IV) группы крови, что свидетельствует о важной роли антигенной детерминанты N-ацетилгалактозамина, которая оказывает влияние на системные воспалительные реакции, а также противоопухолевую защиту иммунной системы [Y. Mao et al., 2019]. S.Y. Miao с коллегами определил, что, пациентки со А(II) группой крови имеют наиболее высокий риск возникновения рака молочной железы. Важным фактом развития онкологической патологии является активность гликозилтрансфераз, которые являются медиаторами межклеточной адгезии и мембранной передачи сигналов, что отражает процессы злокачественной прогрессии и распространении опухолевых клеток [S.Y. Miao et al., 2014].

Группа ученых во главе с J. Zhao сравнили распределение группы крови АВО у 2173 пациентов с новой коронавирусной болезнью - 2019 (COVID-19)

и подтвержденным тестом SARS-CoV-2 из трех больниц в Ухане и Шэньчжэне (Китай) [J. Zhao et al., 2020, J.M. O'Sullivan et al., 2020]. Результаты показали, что группа крови A(II) связана с более высоким риском приобретения COVID-19, тогда как группа крови 0(I) с более низким риском инфицирования по сравнению с другими группами крови. Это первое наблюдение взаимосвязи между группой крови AB0 и COVID-19, однако сопоставимо с предыдущими знаниями. Так, коронавирус SARS-CoV, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром, является высокопатогенным вирусом, который размножается в клетках, которые могут экспрессировать антигены AB0 системы. В исследовании на клеточной модели адгезии в клетках яичника китайского хомячка было выяснено, что естественные антитела системы AB0 могут блокировать взаимодействие гликозилированного белка SARS-CoV spike и ангиотензин-превращающего фермента-2, что указывает на то, что естественные антитела могут блокировать взаимодействие между вирусом и его рецептором, обеспечивая тем самым защиту [P. Guillon et al., 2008].

Можно предположить, что выявленные влияния метаболитов связаны с взаимодействием с ионогенными структурами гликановых детерминант, что ведет к увеличению времени образования белок-белковых комплексов. Пируват, являясь кетокислотой, проявляет кислые свойства, а карбоксильная группа обуславливает отрицательный заряд молекулы. Характерной чертой лактата является наличие гидроксильной группы, которая в некоторых реакциях может замещаться или отщепляться. Принадлежность лактата к гидроксикислотам обуславливает кислые свойства и легкость вступления в различные химические реакции, характерные для карбоновых кислот и спиртов. Поверхность эритроцитов обладает отрицательным зарядом и при взаимодействии с отрицательно заряженными пируватом и лактатом происходит изменение характера аффинитета связи антигена с антителом. Обращает на себя внимание, что лактат, взаимодействуя с углеводными

компонентами детерминант, удлиняет время образования белковых комплексов, причем в большей степени в эксперименте с гликопротеинами с терминальной детерминантой А (N-ацетилгалактозамин) [F.N. Gylmiyarova et al., 2014; Ф.Н. Гильмиярова с соавт., 2015].

Интересными являются данные об уменьшении степени интенсивности взаимодействия антиген-антитело эритроцитов АВ(IV) группы крови, на мембране которых экспессированы оба эпитопа А и В при инкубации как с пируватом, так и лактатом. Таким образом, пируват и лактат оказывают влияние на процессы межбелкового взаимодействия, вероятно, модифицируя конформационную структуру углеводного компонента антигенных детерминант и естественных антител. Следующей задачей нашего исследования является визуализация и количественная оценка белок-белковых взаимодействий на модели антигенов групповой принадлежности крови по системе АВ0.

3.3. Лазерная конфокальная микроскопия как технология биоимаджинга и количественной оценки межбелковых взаимодействий

В настоящее время наиболее перспективными и современными технологиями, позволяющими наблюдать межмолекулярные процессы, являются методы биоимаджинга, характеризующиеся тем, что они сохраняют относительное постоянство состава и свойства внутренней среды, а также процессы взаимодействия между молекулами, как на уровне целого организма, так и на субклеточном уровне. Высокая чувствительность флуоресценции в сочетании с достижениями в области методов измерения позволяет обнаруживать сверхмалые количества белков, меченных флуорофорами, а также связанные с ними взаимодействия с биомолекулами.

Нами была проведена серия экспериментов с применением естественных интермедиатов лактата и пирувата, антигенов А и В системы групп крови АВ0 и специфичных моноклональных конъюгированных антител, меченных

флуоресцеинизотиоционатом (ФИТЦ). Для выявления и количественной оценки влияния исследуемых метаболитов на белок-белковые взаимодействия нами был использован лазерный сканирующий конфокальный микроскоп в режиме основного рассеивания и в режиме флуоресценции [Н.А. Колотьева с соавт., 2016; F.N. Gilmiyarova et al., 2017].

На рисунке 3.6 представлены микрофотографии антиген-антительного взаимодействия гликопротеина А с анти-А моноклональными антителами в режиме основного рассеивания и флуоресценции. Математическая обработка результатов экспериментов, полученных в режиме основного рассеивания приводится в таблице 3.8.

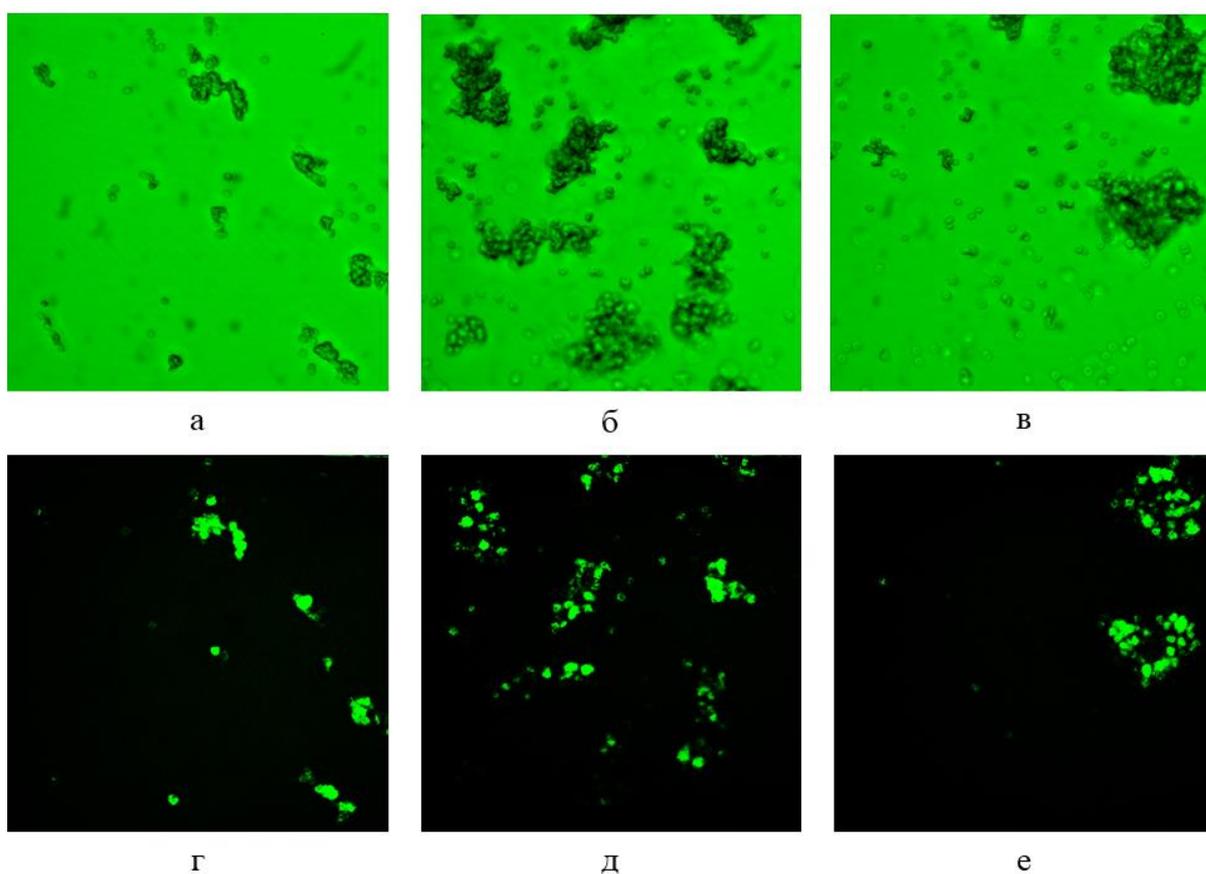


Рисунок 3.6 – Микрофотографии комплексов антиген-антитело
а-в – режим основного рассеивания: а – гликопротеин А (контроль),
б– гликопротеин А + лактат, в– гликопротеин А+пируват
г-е – режим флуоресценции: г– гликопротеин А (контроль),
д– гликопротеин А + лактат, е– гликопротеин А+пируват

Таблица 3.8 – Влияние лактата и пирувата на гликопротеин А в режиме основного рассеивания

	Контроль	А(II) + лак	А(II) + пир
Количество комплексов M ± m	16,25 ± 0,48	48,75 ± 7,36	20,5 ± 5,9
95% ДИ	14,73 – 17,77	25,31 – 72,19	1,74 – 39,26
p		0,004	0,5
		p лактат-пируват=0,02	
Средняя площадь одного комплекса, мкм ² M ± m	499,2 ± 64	759,65 ± 128,7	518,6 ± 149,2
95% ДИ	371,36 - 627	505,75-1013,55	221,67 - 815,53
p		0,04	0,5
		p лактат-пируват=0,003	
Средняя площадь, занимаемая одним комплексом в кадре, % M ± m	0,31 ± 0,04	0,48 ± 0,08	0,32 ± 0,09
95% ДИ	0,23 - 0,39	0,32 - 0,63	0,14 - 0,51
p		0,04	0,5
		p лактат-пируват=0,003	
Средняя сумма площадей, занимаемая всеми комплексами в кадре, % M ± m	5,04 ± 0,62	23,4 ± 1,95	6,56 ± 3
95% ДИ	3,06 - 7	16,70 - 29,13	2,95 - 16,09
p		0,0001	0,63
		p лактат-пируват=0,14	

Выявлено, что инкубация гликопротеина А с лактатом приводит к достоверному увеличению количества комплексов антиген-антитело – $48,75 \pm 7,36$ ($p=0,0045$); средней площади одного комплекса – $759,65 \pm 128,7$ $\mu\text{км}^2$ ($p=0,04$); средней площади, занимаемой одним комплексом в кадре $0,48 \pm 0,08$ % ($p=0,04$) и средней суммы площадей, занимаемой всеми комплексами по отношению ко всему кадру $23,4 \pm 1,95$ % ($p=0,0001$) в сравнении с контролем. При этом внесение в систему пирувата вызывает схожие изменения, но достоверных отличий от контрольной пробы выявлено не было. Эффекты лактата и пирувата на антигенную детерминанту А являются сонаправленными и стимулирующими, но различными по силе вызываемого ответа: внесение лактата приводит к образованию большего количества комплексов в сравнении с пируватом ($p=0,02$), которые занимают большую среднюю площадь ($p=0,003$).

По данным математической обработки полученных микрофотографий (таблица 3.9), инкубация антигена В с лактатом и пируватом вызывает торможение реакции антиген-антитело, что проявляется в уменьшении количества образованных комплексов агглютинатов в сравнении с контролем при внесении лактата – $17 \pm 0,6$ ($p<0,0001$) и пирувата – $32,75 \pm 1,03$ ($p<0,0001$), уменьшении средней площади одного комплекса при взаимодействии с лактатом 390 ± 87 $\mu\text{км}^2$ ($p=0,0006$), пируватом – $302,5 \pm 25,27$ $\mu\text{км}^2$ ($p=0,0006$) и уменьшении средней площади, занимаемой одним комплексом в кадре после инкубации с лактатом $0,24 \pm 0,054$ % ($p=0,001$) и пируватом $0,19 \pm 0,016$ ($p<0,0001$). Отметим, что в данном случае воздействие метаболитов на экспериментальную систему являлось сонаправленным и ингибирующим, однако различие в силе эффекта, оказываемого лактатом и пируватом проявлялось только в количестве образованных комплексов ($p=0,0001$), для остальных параметров отличия воздействия пирувата от лактата не были выявлены. Микрофотографии

взаимодействия гликопротеина В с исследуемыми метаболитами представлены на рисунке 3.7.

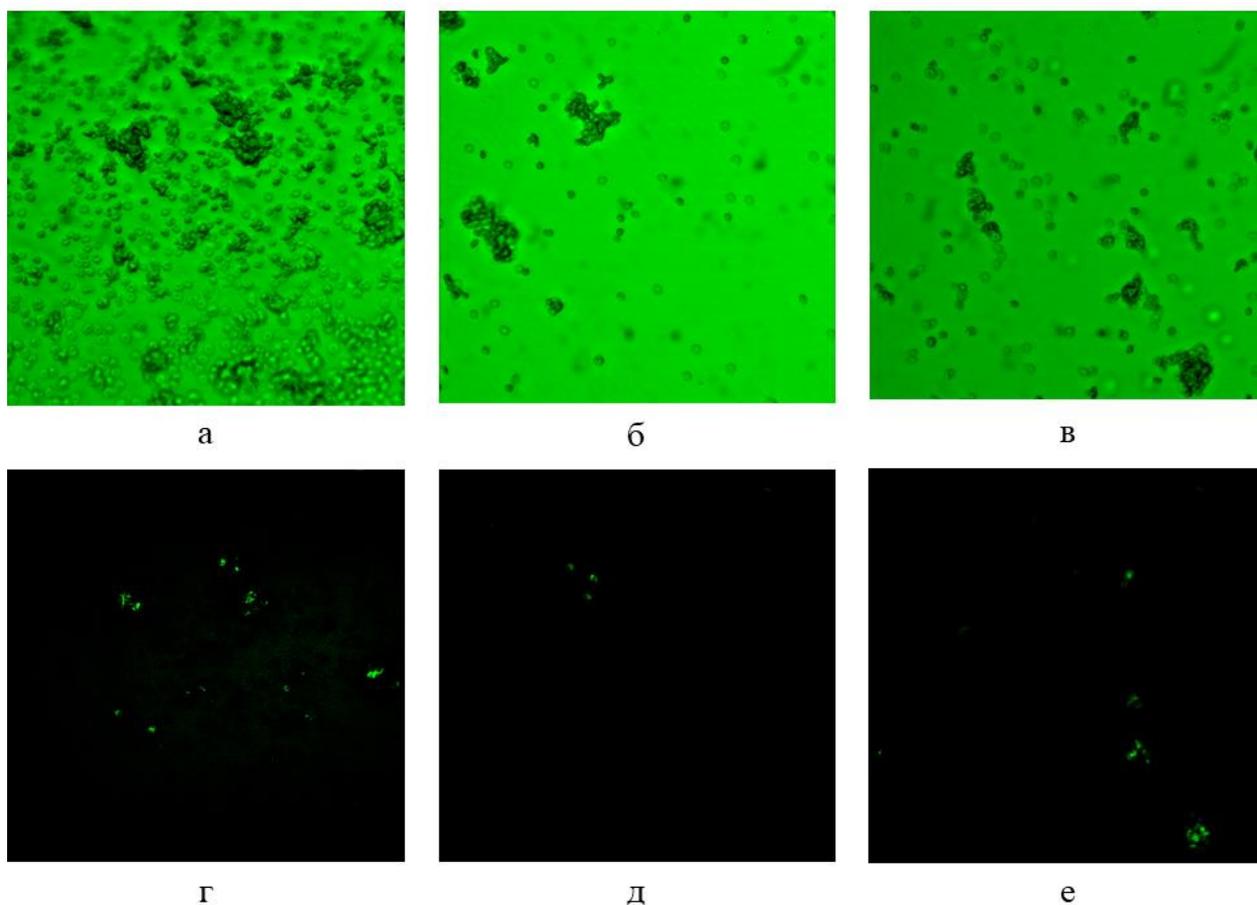


Рисунок 3.7 – Микрофотографии комплексов антиген-антитело

а-в – режим основного рассеивания:

а– гликопротеин В (контроль),

б– гликопротеин В + лактат, в– гликопротеин В +пируват

г-е – режим флуоресценции:

г– гликопротеин В (контроль),

д– гликопротеин В + лактат,

е– гликопротеин В +пируват

Таблица 3.9 – Влияние лактата и пирувата на гликопротеин В в режиме основного рассеивания

	Контроль	В (III) + лактат 2мМ	В (III) + пируват 2мМ
Количество комплексов M ± m	55,5 ± 1,7	17 ± 0,6	32,75 ± 1,03
95% ДИ	50,22 - 60,78	14,52 - 19,48	29,47 - 36,03
р		< 0,0001	<0,0001
		р лактат-пируват= 0,0001	
Средняя площадь одного комплекса, мкм ² M ± m	697,4 ± 39,5	390 ± 87	302,5 ± 25,27
95% ДИ	619,62-775,2	215,03-564,8	252,48 - 352,46
р		0,001	<0,0001
		р лактат-пируват= 0,197	
Средняя площадь, занимаемая одним комплексом в кадре, % M ± m	0,44 ± 0,025	0,24 ± 0,054	0,19 ± 0,016
95% ДИ	0,39 - 0,49	0,13 - 0,35	0,16 - 0,22
р		0,001	<0,0001
		р лактат-пируват= 0,197	
Средняя сумма площадей, занимаемая всеми комплексами в кадре, % M ± m	24,42 ± 2,17	4,08 ± 0,64	6,2 ± 0,87
95% ДИ	17,04 - 30,86	1,36 - 6,87	3,36 - 8,90
р		0,0006	0,0003
		р лактат-пируват= 0,143	

Представленный анализ микрофотографий реакции антиген-антитело в режиме основного рассеивания носит достаточно точный характер, однако, не позволяет исключить ряд неспецифических взаимодействий, которые могут вносить вклад в видимый эффект агрегации. Для повышения точности интерпретации в таблице 3.10 представлены результаты математической обработки микрофотографий в режиме флуоресценции, при котором эмиссия регистрируется только от комплексов антигена и соответствующего ему моноклонального антитела, меченного флуорофором.

Таблица 3.10 – Влияние лактата и пирувата на гликопротеины А и В в режиме флуоресценции

	Контроль А(II)	А(II) + лактат	А(II) + пируват	Контроль В(III)	В(III) + лактат	В(III) + пируват
Средняя интенсивность пикселя green, у.е. М ± m	6,2 ± 0,98	13,4 ± 1,97	6,8 ± 0,1	2,7 ± 0,05	0,2 ± 0,04	0,28 ± 0,073
95% ДИ	3,45 - 8,90	7,09 - 19,64	6,41 - 7,11	2,51 -2,85	0,05 - 0,32	0,05 - 0,52
Изменение, %		+116,5	+9,5		-93	-89,4
p		0,01	0,62		<0,0001	<0,0001
p лактат-пируват = 0,01				p лактат-пируват = 0,3		

Полученные результаты демонстрируют сохранение тенденции, показанной в таблицах 3.8 и 3.9 ранее. Внесение лактата и пирувата в экспериментальную систему с антигеном А приводит к увеличению средней интенсивности зеленого пикселя в кадре, при этом эффект лактата выражен сильнее, чем пирувата и составляет $13,4 \pm 1,97$ у.е. в сравнении с $6,8 \pm 0,1$ у.е., разница в эффекте метаболитов достоверна ($p=0,01$). Инкубация антигена В с исследуемыми метаболитами приводит к достоверному снижению средней интенсивности зеленого пикселя в сравнении с контролем (лактат – $0,2 \pm 0,04$, $p<0,0001$, пируват – $0,28 \pm 0,073$, $p<0,0001$) при этом эффект лактата и пирувата в данном случае соизмерим по выраженности и не отличим друг от друга. Наблюдаемое отличие в реакции антигенных детерминант на внесение интермедиатов может быть объяснено с позиции химической структуры: антигены А и В имеют общее вещество-предшественник – фукозу, однако отличаются концевыми детерминантами: у антигена А N-концевой олигосахарид представлен N-ацетилгалактозамином, у антигена В – галактозой.

Серии проведенных исследований по изучению влияния биологически активных метаболитов с использованием экспериментальной модели на основе групп крови системы АВ0, включающей гликопротеины А и В, естественные анти-А и анти-В антитела показали, что пируват и лактат участвуют в белок-белковых взаимодействиях. Методами агглютинации на плоскости и конфокальной микроскопии выявлено, что в отношении действия на антигенные детерминанты А и В эффекты пирувата и лактата являются сонаправленными, однако действие лактата выражено сильнее, чем пирувата, что также было предсказано методами *in silico* в программе PASS и STITCH. Влияние на гликопротеин А выражается в увеличении времени образования комплексов антиген-антитело, усилении процесса агрегации, что проявляется в увеличении числа комплексов, их площади и средней интенсивности пикселя по зеленому цвету. В случае антигена В наблюдается

эффект торможения вступления в реакцию антиген-антитело, подтверждается уменьшением числа сформированных комплексов, их площади и средней интенсивности пикселя по зеленому цвету. С одинаковой степенью интенсивности на введение пирувата и лактата реагируют эпитопы А и В АВ(IV) группы крови, что вероятно связано с особенностью строения эритроцитов – наличием двух антигенных детерминант и их межмолекулярным взаимодействием с малыми молекулами. В экспериментах с естественными антителами выявлено, что анти-В антитела подвержены более сильному влиянию как пирувата, так и лактата, что проявляется в разнонаправленном изменении степени агглютинации, что вероятно связано с их большей конформационной перестройкой, в отличие от анти-А антител.

Компьютерный анализ биологической активности пирувата и лактата выявил широкий спектр смоделированных эффектов и партнеров взаимодействия. Нами было показано, что изучаемые естественные интермедиаты оказывают влияние на антигенные детерминанты в экспериментальной системе, однако природа влияния на процессы межбелковых взаимодействий оставляет много вопросов. Биоимаджинг полученных белковых комплексов с использованием конфокального микроскопа с большей достоверностью показывает роль пирувата и лактата в межмолекулярных процессах. Вероятно, изучаемые биологически активные соединения взаимодействуют с активными функциональными группами детерминант, влияют на микроокружение центра связывания гликановой части антигена, вызывая конформационные перестройки молекулы в целом, оказывая влияние на процессы взаимодействия антигенов с естественными антителами.

Изученные процессы образования антиген-антительных комплексов являются недостаточно изолированной системой, из-за действия разнообразных факторов окружающей эритроцит среды, в том числе многочисленных белков, которые также могут вступать в реакции с

биологически активными соединениями. Поэтому нами для дальнейшего изучения влияния естественных интермедиатов были выбраны монокаталитические белки, обладающие свойствами и функциями, поддающимися количественной оценке. В качестве объекта дальнейшего изучения были выбраны каталитические системы: глицерофосфатдегидрогеназная, лактатдегидрогеназная, малатдегидрогеназная.

ГЛАВА IV.

ГЛИЦЕРОФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗА И ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА – ОБЪЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С МАЛЫМИ МОЛЕКУЛАМИ

4.1. Компьютерное моделирование прогнозируемых биологических свойств оксалоацетата и малата

4.1.1. Оценка биологической активности оксалоацетата и малата в программе PASS

В настоящее время имеется много сведений о структурно-функциональном многообразии белкового состава человека, однако малоизученной остается область межбелковых лигандных взаимодействий, где лигандами выступают биологически активные соединения с малой молекулярной массой. Благодаря современным технологиям, программам и алгоритмам, основанным на анализе многочисленных библиотек данных, исследователь может произвести предварительный поиск возможных взаимодействий малых молекул с белками – партнерами, сформировать карту вероятных мишеней и выбрать наиболее актуальную область исследований. В центре нашего внимания молекулы оксалоацетат и малат – окислительно-восстановительные партнеры, переключатели обменов, для которых необходимо оценить биологическую активность и смоделировать возможные взаимодействия с определенными белковыми партнерами.

Изученные спрогнозированные фармакологические проявления, смоделированные в компьютерной среде PASS представлены в таблице 4.1. Имеются данные об участии данных интермедиатов в липидном, белковом, углеводном обменах.

Нами было отмечено влияние изучаемых молекул на регуляцию обмена липидов (P_a оксалоацетата 0,585 и P_a малата 0,901), проявляя антигиперхолестеролемический эффект (P_a малата 0,576), ингибируя транс-2-еноил-КоА редуктазу (P_a оксалоацетата 0,609), которая участвует в

биосинтезе ненасыщенных жирных кислот и в элонгации жирных кислот в митохондриях, ацилкарнитин гидролазу (Ра малата 0,953; Ра оксалоацетата 0,919); цитохром-b5-редуктазу (Ра оксалоацетата 0,687 и Ра малата 0,617), участвующей в образовании полиненасыщенных жирных кислот, глицерол-3-фосфатдегидрогеназу. Интересным являются данные, о том, что оксалоацетат (Ра 0,483) и малат (Ра 0,698) являются усилителями экспрессии гена APOA1, играя специфическую роль в метаболизме липидов. Оксалоацетат и малат ингибируют ферменты белкового обмена: аланинтрансаминазу, серин-3-дегидрогеназу, триптофантрансаминазу.

Таблица 4.1 – Вероятные молекулярные механизмы действия оксалоацетата и малата

Молекулярный механизм действия	Шифр фермента	Ра оксалоацетат	Ра малат
Ингибитор L-лактатдегидрогеназы цитохрома	EC 1.1.2.3	0,794	0,822
Ингибитор D-лактатдегидрогеназы цитохрома	EC 1.1.2.4	0,783	0,857
Ингибитор оксалоацетат таутомеразы	EC 5.3.2.2	0,895	0,747
Ингибитор глицерол-3-фосфатоксидазы	EC 1.1.3.21	0,628	0,571
Ингибитор малатдегидрогеназы	EC 1.1.1.37	0,708	0,662
Ингибитор оксалоацетат декарбоксилазы	EC 4.1.1.3.	0,815	0,568
Ингибитор глицерол-3-фосфатдегидрогеназы	EC 1.1.1.8	0,675	0,501
Ингибитор акцептора малатдегидрогеназы	EC 1.1.1.37	0,563	0,538
Ингибитор малатоксидазы	EC 1.1.3.3	0,562	0,518
Ингибитор D-малат декарбоксилирующей дегидрогеназы	EC 1.1.1.83	0,711	0,623
Ингибитор НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы (декарбоксилирующей оксалоацетат)	EC 1.1.1.40	0,655	0,593

Молекулярный механизм действия	Шифр фермента	Ра оксало-ацетат	Ра малат
Ингибитор лактат-малат трансгидрогеназы	ЕС 1.1.99.7	0,581	0,66
Ингибитор НАДФ-зависимой декарбоксилирующей малатдегидрогеназы	ЕС 1.1.1.82	0,586	0,559
Ингибитор фосфоенолпируват протеинфосфотрансферазы	ЕС 2.7.3.9	0,851	0,872
Ингибитор пируват декарбоксилазы	ЕС 4.1.1.1	0,827	0,846
Ингибитор аспартат-фенилпируваттрансаминазы	ЕС 2.6.1.70	0,818	0,773
Ингибитор глутами-фенилпируваттрансаминазы	ЕС 2.6.1.64	0,856	0,837
Ингибитор пируватдегидрогеназы (цитохрома)	ЕС 1.2.2.2	0,609	
Ингибитор фенилпируватдекарбоксилазы	ЕС 4.1.1.43	0,807	0,614
Ингибитор пируватдегидрогеназы	ЕС 1.2.4.1.	0,802	0,736
Ингибитор фосфоенолпируваткарбоксикиназы	ЕС 4.1.1.38	0,786	0,582
Ингибитор аланинтрансаминазы	ЕС 2.6.1.2	0,916	0,591
Ингибитор серин-3-дегидрогеназы	ЕС1.1.1.276	0,733	0,895
Ингибитор триптофантрансаминазы	ЕС 2.6.1.27	0,647	0,613
Ингибитор сукциантдегидрогеназы	ЕС 1.3.5.1	0,755	0,42

Известно действие оксалоацетата и малата на углеводный обмен: оказывают ингибирующее влияние на ряд ключевых ферментов, таких как L- и D- формы лактатдегидрогеназы, разных форм малатдегидрогеназы, малатоксидазы, многоферментного пируватдегидрогеназного комплекса и другие (таблица 4.1). Таким образом, естественные метаболиты оксалоацетат и малат оказывают разнообразные фармакологические эффекты, влияющие на активность факторов, регулирующих межмолекулярные взаимодействия.

Оксалоацетат оказывает ингибирующее воздействие на сукцинатдегидрогеназу, которая является не только участником цикла Кребса, но и важным элементом в цепи переноса электронов. Установлено, что нарушение функции сукцинатдегидрогеназы сопровождается рядом патологических состояний, таких как синдром Ли [J. Finister, 2008], синдром семейной параганглиомы [Y.F. Her, L.J. Masher, 2015], нейроэндокринные опухоли [Armstrong R. et al., 2009].

Обращает на себя внимание оксалоацетата и малата на экспрессию генов (таблица 4.2). Изучаемые биологически активные соединения усиливают экспрессию гена НМОХ1, кодирующего белок гемоксигеназу-1 (Pa 0,574 для оксалоацетата, Pa 0,540 для малата), и гена JAK2 (Pa 0,661 для оксалоацетата, Pa 0,549 для малата) которые регулирует жизнеспособность, пролиферацию и дифференцировку многих типов клеток.

Интересным представляется тот факт, что оксалоацетат (Pa 0,599) и малат (Pa 0,699) усиливают экспрессию гена TP53. Белок p53 выполняет функцию супрессора образования злокачественных опухолей, благодаря этому ген TP53 является антионкогеном [V.A. Chavez-Perez et al., 2011]. Предсказано ингибирующее влияние оксалоацетата (Pa 0,601) и малата (Pa 0,594) на экспрессию гена MMP9 - белка семейства матриксных металлопротеиназ. Помимо этого, предсказано, что оксалоацетат (Pa 0,514) и малат (Pa 0,566) уменьшает экспрессию гена фактора некроза опухоли (TNF), кодирующего многофункциональный провоспалительный цитокин, который в основном секретируется макрофагами, участвует в регуляции широкого спектра биологических процессов. Кроме того, смоделировано, что естественные интермедиаты оксалоацетат (Pa 0,506) и малат (Pa 0,422) ингибируют HIF1A фактор, индуцируемый гипоксией 1, выполняющего функции в качестве главного регулятора транскрипции адаптивного ответа на гипоксию.

Таблица 4.2 – Влияние оксалоацетата и малата на экспрессию генов

Влияние на экспрессию генов	Pa оксало- ацетата	Pi оксало- ацетата	Pa малата	Pi малата
Усилитель экспрессии гена гемоксигеназы HMOX1	0,574	0,023	0,54	0,028
Усилитель экспрессии гена TP53 (белок p53)	0,599	0,05	0,699	0,026
Ингибитор экспрессии гена JAK2	0,661	0,022	0,549	0,042
Ингибитор экспрессии гена MMP9 (семейство матриксных металлопротеиназ)	0,601	0,015	0,594	0,016
Ингибитор экспрессии гена TNF (фактор некроза опухоли)	0,514	0,026	0,566	0,017
Ингибитор экспрессии HIF1A фактор, индуцируемый гипоксией 1-альфа, белок.	0,506	0,055	0,422	0,089
Ингибитор экспрессии гена EIF4E (эукариотический фактор инициации трансляции 4E)	0,518	0,008	0,499	0,011
Ингибитор экспрессии гена BRAF (белок, B-Raf (протоонкоген))	0,683	0,004	0,793	0,002
Усилитель экспрессии APOA1	0,483	0,032	0,698	0,005

Анализируя полученные данные в компьютерной системе PASS, обращает на себя внимание проявление разнообразных эффектов оксалоацетатом и малатом. Среди них регуляция липидного, белкового, углеводного обменов, влияние на экспрессию генов. Отмечается использование естественных метаболитов в качестве терапевтического

средства для лечения фобических расстройств с высокой степенью вероятности у оксалоацетата $P_a=0,916$, у малата $P_a=0,904$, что, связано с проявлением нейропротекторного действия. Системное введение оксалоацетата может представлять собой новую нейропротективную стратегию минимизации вредного воздействия глутамата на ткани головного мозга после ишемического инсульта [Н.А. Yamamoto et al., 2003; D. Nagy et al., 2009; F. Campos et al., 2012].

4.1.2. Изучение вероятных белков-партнеров для оксалоацетата и малата в среде STITCH

Для изучения межмолекулярных взаимодействий между белками и окислительно-восстановительными партнерами оксалоацетатом и малатом мы использовали программу STITCH версии 5.0. (Search Tool for Interacting Chemicals). Сети взаимодействия исследуемого соединения с межмолекулярными партнерами были построены по аффинитету связи, использовался средний порог достоверности $p>0,4$.

Отмечаются взаимодействия исследуемых малых молекул с рецепторами, белками-переносчиками, гормонами, ферментами, на основании которых были построены молекулярные модели (рисунок 4.1, 4.2).

Известным является факт взаимодействия оксалоацетата и малата в качестве субстратов с ферментом малатдегидрогеназа и ее различными изоформами (MDH1 и MDH2); фосфоенолпируваткарбоксикиназа 1.

Оксалоацетат и малат с одинаково высокой степенью вероятности вступает во взаимодействие с белками семейства транспортёров растворённых веществ (Solute Carrier Family – SLC25), которые участвуют в транслокации малоната, малата и сукцината в обмен на фосфат, сульфат, сульфит или тиосульфат через митохондриальную внутреннюю мембрану (SLC25A10); катализируют транспорт 2-оксоглутарата через внутреннюю митохондриальную мембрану (SLC25A11); участвуют в обмене цитрат - $H(+)$ / малат (SLC25A1).

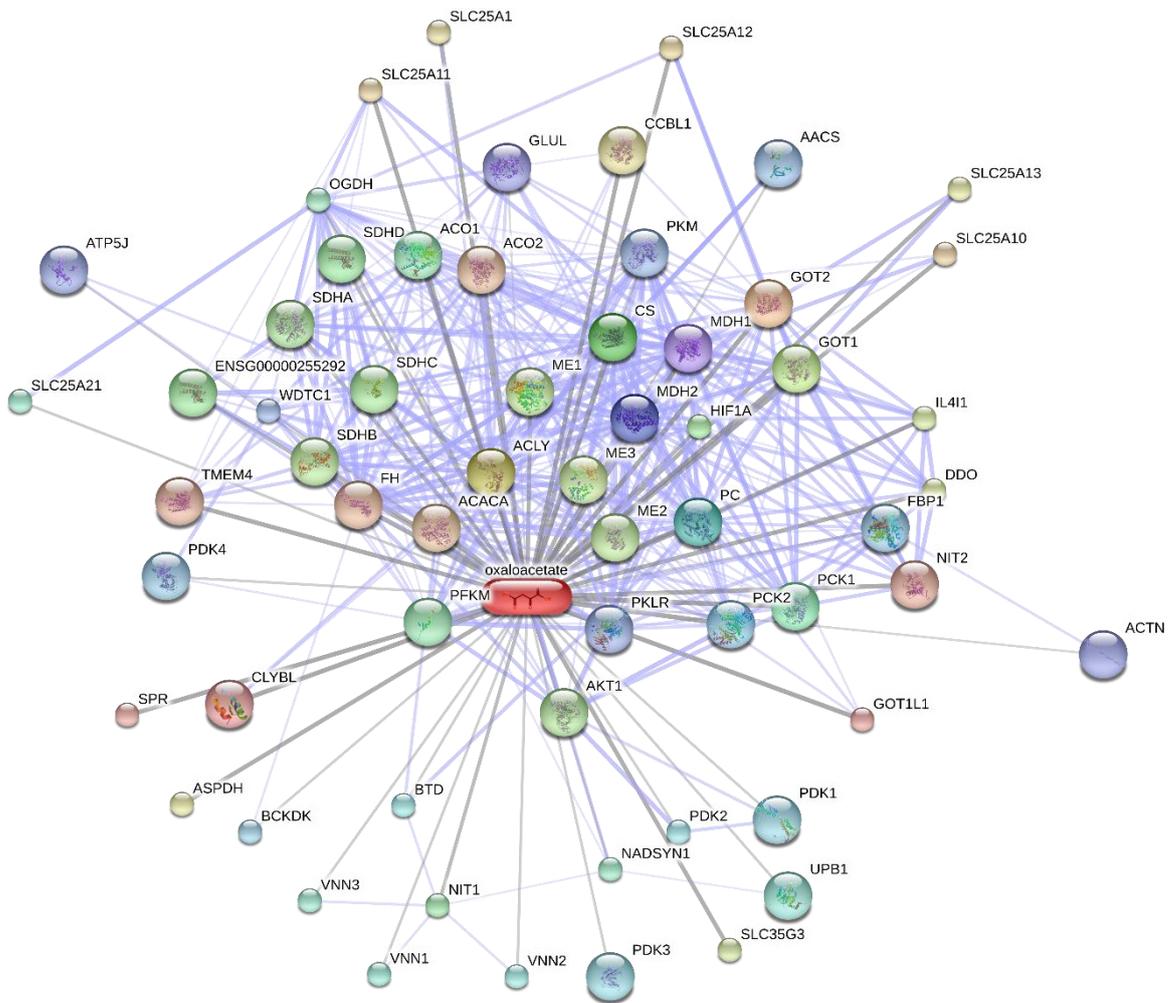


Рисунок 4.1 – Молекулярная модель взаимодействия оксалоацетата с партнерами, степень достоверности средняя $p > 0,4$.

Спрогнозировано содействие оксалоацетата и малата с различными изоформами яблочного фермента: цитозольной НАДФ(+)-зависимой изоформы (ME1), митохондриальной НАДФ(+)-зависимой изоформы (ME3) и митохондриальной НАД(+)-зависимой изоформы (ME2) [А.Р. Halestrap, 2012].

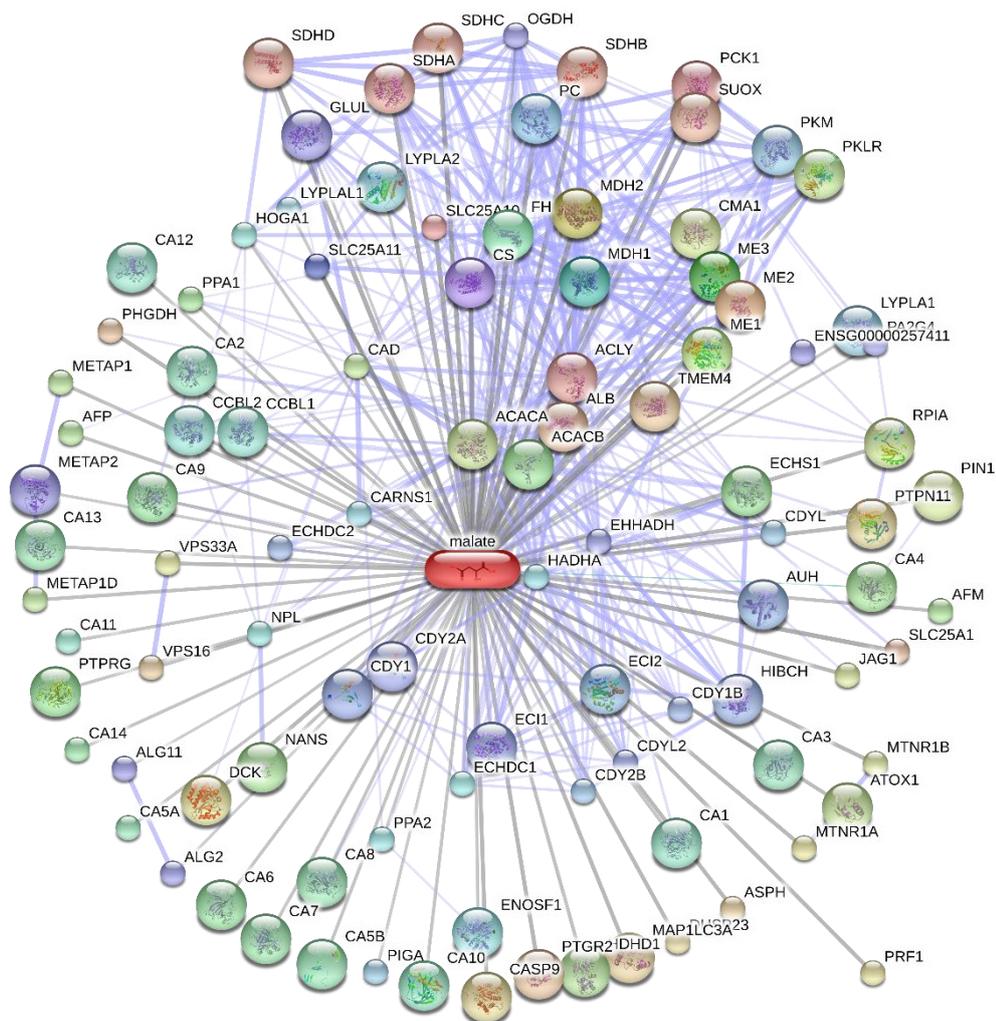


Рисунок 4.2 – Молекулярная модель взаимодействия малата с партнерами, степень достоверности средняя $p > 0,4$.

Интересными являются данные, совпадающие с данными из системы PASS, о взаимосвязи оксалоацетата и малата с комплексом сукцинатдегидрогеназы (субъединицами А, В, С, D), было доказано, что оксалоацетат опосредует АДФ-зависимое ингибирование дыхания, вызванного митохондриальным комплексом II [B.D. Fink et al., 2018]. Оксалоацетат (0,992) и малат (0,922) с высокой степенью вероятности являются белками партнерами для оксоглутарат дегидрогеназы; цитрат-синтазы; пируваткарбоксилазы; АТФ-цитрат-лиазы, которая играет

центральную роль в синтезе липидов *de novo*; фумаратгидратазы, которая также действует как супрессор опухолей.

Обращает на себя способность взаимодействия малата с рядом белков, таких как: альбумин (0,834); вакуолярным белком (0,800); белком, связанным с микротрубочками, который участвует в образовании аутофагосомных вакуолей (0,800); перфорин 1 (порообразующим белком), играющим ключевую роль в секреторной клеточно-зависимой гибели клеток и в защите от инфицированных вирусом или опухолевых клеток (0,800); альфа-фетопротейн (0,705); витамин E, связывающим белком (0,705); а также выступать лигандом для JAG1 рецептора (0,800) и высокоаффинного рецептора мелатонина (0,800).

Отмечена вероятность оксалоацетата являться партнером взаимодействия для аспаратаминотрансфераз 1 и 2 типов (GOT1 $p=0,990$, GOT2 $p=0,993$, GOT1L1 $p=0,968$), оказывая нейропротекторное действие [L. Martin et al., 2014]; митохондриальной фосфоенолпируваткарбоксикиназы 2 ($p= 0,980$); митохондриальной аконитазы 2 ($p= 0,924$), цитратсинтазы ($p= 0,985$) [S. Korkes et al., 1950], пируваткарбоксилазы ($p= 0,984$) [P.V. Attwood, W.W. Cleland, 1986], фумаразы ($p= 0,937$) и малатдегидрогеназы ($p= 0,979$) [M.I. Dolin, 1968]. Смоделирована возможность оксалоацетата связываться с интерлейкином 4 ($p= 0,900$); альфа-субъединицей гипоксия индуцируемого фактора (HIF1 $p= 0,800$), что позволяет опосредованно влиять на экспрессию генов, отвечающих за адаптацию клеток к условиям гипоксии [G.L. Semenza, 2004] что совпадает с данными программы PASS.

В таблице 4.3. предсказаны в компьютерной среде STITCH с высокой степенью достоверности общие для оксалоацетата и малата белки-партнеры.

Таким образом, оксалоацетат и его окислительно-восстановительный партнер малат, являются «точкой пересечения» многих метаболических путей обмена белков, углеводов, липидов.

Таблица 4.3 – Спрогнозированные белки – партнеры взаимодействия с оксалоацетатом и малатом

Белки - партнеры		Оксалоацетат	Малат
ACLY	АТФ-цитрат-лиаза	0.992	0.922
CS	цитрат-синтаза	0.985	0.937
PCK1	фосфоенолпируваткарбоксикиназа 1	0.985	0.929
PC	пируваткарбоксилаза	0.984	0.953
MDH1	малатдегидрогеназа 1	0.976	0.978
MDH2	малатдегидрогеназа 2, митохондриальная	0.979	0.990
FH	фумаратгидратаза	0.937	0.986
SLC25A10	семейство растворенных белков 25, дикарбоксилатный транспортер	0.916	0.936
SLC25A11	семейство растворенных белков 25, оксоглутаратный транспортер	0.916	0.950
SLC25A1	семейство носителей растворенного вещества 25 транспортер цитрата	0.911	0.909
ME1	яблочный фермент 1, НАДФ(+)-зависимый, цитозольный	0.859	0.987
ME2	яблочный фермент 2, НАД(+)-зависимый, митохондриальный	0.848	0.996
ME3	яблочный фермент 3, НАДФ(+)-зависимый, митохондриальный	0.864	0.986
SDHC	комплекс сукцинатдегидрогеназы, субъединица С, цельный мембранный белок	0.811	0.918
SDHA	комплекс сукцинатдегидрогеназы, субъединица А, флавопротеин	0.818	0.915
SDHB	комплекс сукцинатдегидрогеназы, субъединица В, железная сера (Ір);	0.834	0.914
SDHD	комплекс сукцинатдегидрогеназы, субъединица D, цельный мембранный белок;	0.765	0.912
ACACA	ацетил-КоА-карбоксилаза альфа	0.923	0.775
OGDH	оксоглутарат дегидрогеназа (липоамид)	0.611	0.578

Благодаря центральной роли в энергетическом обмене, оксалоацетат был назван биоэнергетическим лекарственным препаратом, специально разработанным для повышения уровня энергии клеток [R.H. Swerdlow, 2014].

Поскольку в представленных результатах отмечено большое количество ферментов как мишеней взаимодействия, следующим этапом было проведение серии экспериментов *in vitro*, направленных на изучение взаимодействия оксалоацетата, малата, пирувата, лактата с монокаталитическими белками лактатдегидрогеназой и глицерол-3-фосфатдегидрогеназой.

4.2. Конформационные изменения глицерофосфатдегидрогеназы при взаимодействии с пируватом, лактатом, оксалоацетатом и малатом

Понимание роли малых молекул в регуляции биологических и каталитических процессов сегодня выходит на качественно новый уровень. Являясь лигандами более крупных структур, белков в частности, молекулы малой массы связываются с активными и аллостерическими центрами с помощью ковалентных и нековалентных связей. Последствия такого связывания переменны: они могут приводить к изменению конформации молекулы, а значит, и к перемене функциональных свойств белка [H.A. Flaxman, S.M. Woo, 2018]. Понимание природы таких взаимодействий несет в себе важную информацию о биохимии самой белковой молекулы, ее способности к распознаванию лигандов, степени их ассоциации, регуляторных возможностях лигандных процессов в целом. Установление факта взаимодействия малой молекулы с белком стало более доступно с применением методов флуоресценции (как эндогенной, так и с использованием флюорофоров), сканирующей флуориметрии, микротермофореза [L. Jin et al., 2014].

4.2.1. Метод капиллярного термофореза для установления факта взаимодействия глицерофосфатдегидрогеназы с пируватом, лактатом, оксалоацетатом и малатом

Степень сродства лиганда к молекуле белка определяет дальнейшее понимание процесса межмолекулярного взаимодействия и раскрывает структурно-функциональные особенности реагирующих веществ. Для оценки степени сродства использовали стехиометрический параметр – константу диссоциации, численно равный концентрации лиганда, при которой содержание свободной и связанной молекулы-партнера равны.

Измерения производились при постоянной концентрации глицерофосфатдегидрогеназы равной 0,8 мкМ и в изменяющихся концентрациях растворов интермедиата (от 40 до 0,0012 мкМ) пирувата, лактата, оксалоацетата и малата. Были определены значения нормализованной флуоресценции, построены графики зависимости нормализованной флуоресценции от концентрации белка и определены равновесные константы диссоциации меченой глицерофосфатдегидрогеназы и исследуемого метаболита. На рисунке 4.3 А, В, Д, Ж показаны термофоретические кривые несвязанного и связанного с биологически активными соединениями состояния меченого фермента глицерофосфатдегидрогеназы. На рисунках 4.3 Б, Г, Е, З отображен анализ взаимодействий пирувата, лактата, оксалоацетата, малата с глицерофосфатдегидрогеназой с применением программного обеспечения Nano Temper Analysis Software Package. Обращает на себя внимание различное сродство метаболитов к молекуле белка. Константы диссоциации глицерофосфатдегидрогеназы с оксалоацетатом составила 3,17 мкМ, пируватом 6,59 мкМ, малатом 3,89 мкМ, лактатом 1,0 мкМ. Представленные значения константы диссоциации свидетельствуют о достаточно сильном сродстве естественного метаболита лактата к молекуле глицерофосфатдегидрогеназы и более слабом аффинитете связи к другим малым молекулам – пирувату, оксалоацетату, малату.

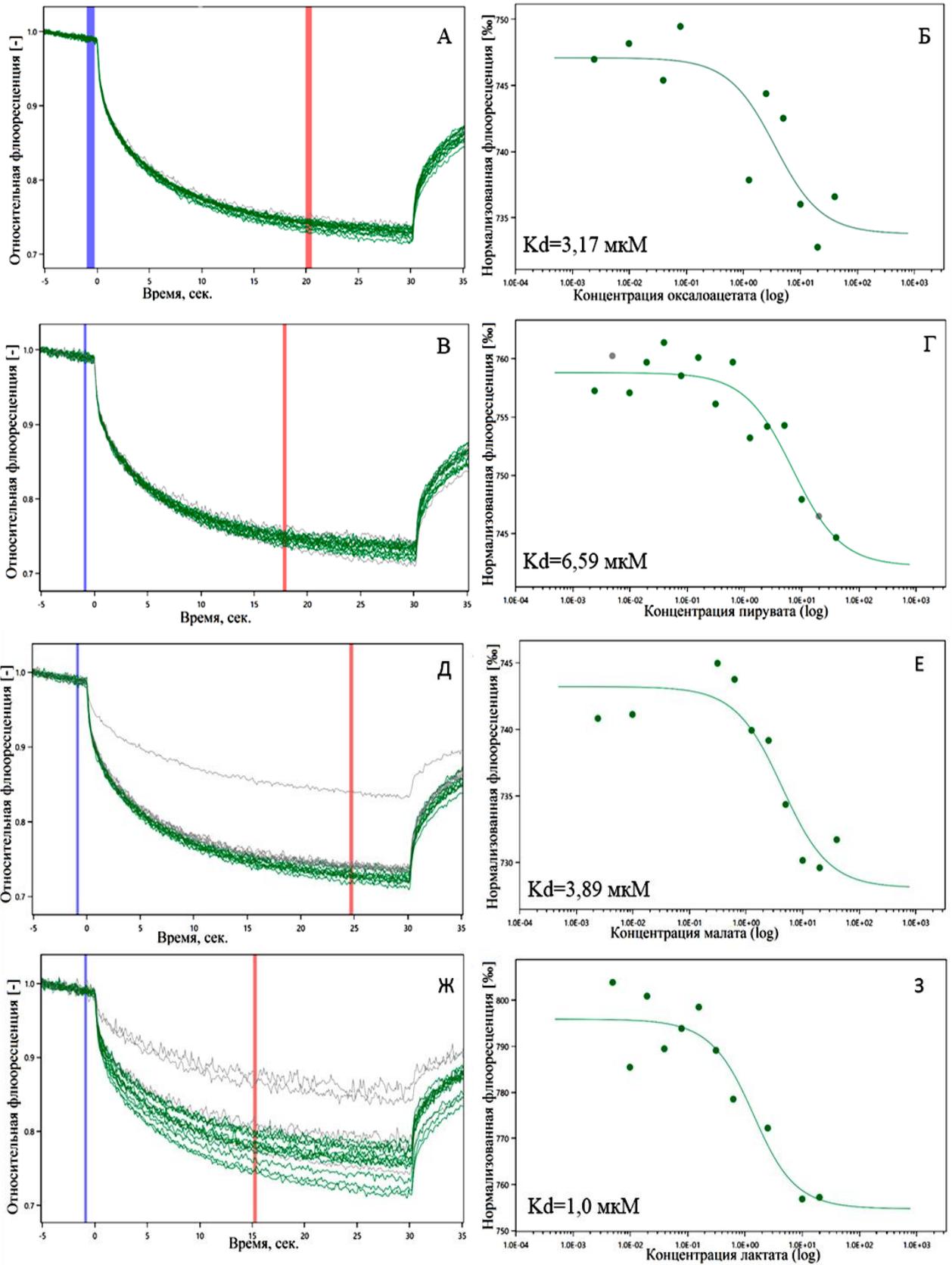


Рисунок 4.3 – Взаимодействие глицерофосфатдегидрогеназы с оксалоацетатом (А, Б), пируватом (В, Г), малатом (Д, Е) и лактатом (Ж, З)

Сродство связывания – это параметр, характеризующий силу связывания между белком и малой молекулой, что является ключом к оценке биологических процессов, лежащих в основе межмолекулярного взаимодействия. Константа равновесной диссоциации используется для описания аффинности между биомолекулой и лигандом, чем ниже это значение, тем выше сила связывания лиганда к его молекулярной мишени. На константу диссоциации влияют электростатические, гидрофобные, силы Ван-дер-Ваальса, водородные связи. Следует отметить, что в большинстве случаев константа равновесной диссоциации численно соответствует константе Михаэлиса-Ментен, которая используется для описания аффинитета связи белка к лиганду и применима лишь при стационарном состоянии, что не часто происходит в эксперименте [B.F. Lassetter, 2019].

4.2.2. Изучение термолабильности глицерофосфатдегидрогеназы под влиянием пирувата, лактата, оксалоацетата и малата

Дифференциальная сканирующая флуориметрия позволяет быстро и точно оценивать фолдинг белка, а также его химическую и термическую стабильность с использованием внутренней триптофана или тирозина флуоресценции при длинах волны 330 и 350 нм. Термическая стабильность белка описывается «температурой плавления» (T_m), при которой половина белка находится в свернутом состоянии, что соответствует точке температурного перехода, а вторая часть денатурировалась, результат регистрируется в градусах Цельсия. При высокой температуре белки, в том числе ферменты, обладающие упорядоченной структурой, разворачиваются, что приводит к изменению окружения ароматических остатков. Лиганды, имеющие более высокое сродство к каталитическому белку, сдвигают точку температурного перехода в большей степени. Правильность определения термической стабильности в том числе зависит от насыщения молекулы белка исследуемым биологически активным соединением.

Таблица 4.4 – Точки температурного перегиба глицерофосфатдегидрогеназы при добавлении естественных интермедиатов в различных концентрациях

Концентрация лиганда, мкМ	Оксалоацетат	Пируват	Малат	Лактат
	t перегиба, °С	t перегиба, °С	t перегиба, °С	t перегиба, °С
16	51,7	52,3	52,3	51,8
8	51,6	51,7	40,9	51,7
4	61,6	51,8	51,7	51,4
2	51,7	51,6	51,7	51,7
1	51,8	51,7	51,9	51,4
0,5	51,4	51,5	51,8	51,6
Контроль 51,4°С				

В таблице 4.4 представлена температура плавления (T_m) перегиба глицерофосфатдегидрогеназы при постоянной концентрации 1 мкМ после инкубации с естественными интермедиатами (оксалоацетат, пируват, малат, лактат) в изменяющейся конечной концентрации (от 16 до 0,5 мкМ). Контрольное значение точки температурного перегиба глицерофосфатдегидрогеназы составила 51,4°С. При добавлении оксалоацетата в концентрации 4 мкМ произошел максимальный сдвиг наступления температурного перегиба – 61,6°С, для пирувата и малата в конечной концентрации 16 мкМ температурный перегиб составил 52,3°С, что свидетельствует о повышении термостабильности фермента и свернутой конформации. Более быстрое наступление точки температурного перегиба характерно для комплекса глицерофосфатдегидрогеназы с малатом в концентрации 8 мкМ, что выражается в снижении его термостабильности.

На рисунках 4.4-4.7 представлены кривые плавления глицерофосфатдегидрогеназы в комплексах с малыми молекулами: оксалоацетатом, малатом, пируватом, лактатом. Для анализа мы

использовали графики первых производных полученных кривых, максимум пика которых соответствует температуре перегиба белка. На верхнем графике показана зависимость отношений флуоресценции при 330 и 350 нм от температуры, на нижнем графике отображены кривые первой производной значений отношений флуоресценции в зависимости от температуры.

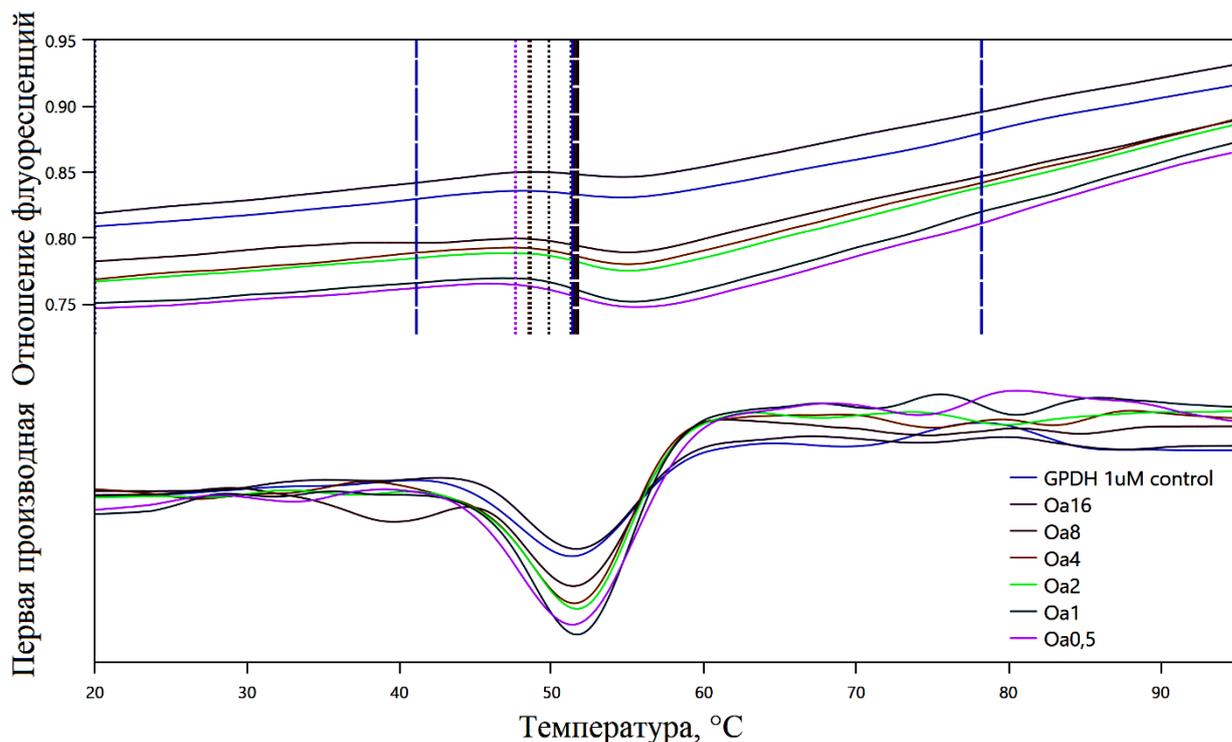


Рисунок 4.4 – Кривые плавления глицерофосфатдегидрогеназы в комплексе с оксалоацетатом в различной концентрации

Полученные данные показывают, что температура плавления фермента с различными концентрациями биологически активных соединений соответствуют самые глубокие точки образовавшегося пика на кривой первой производной. При малой разнице в полученных температурах плавления глицерофосфатдегидрогеназы отмечается различное состояние комплексов с малыми молекулами, что проявляется различной глубиной пиков.

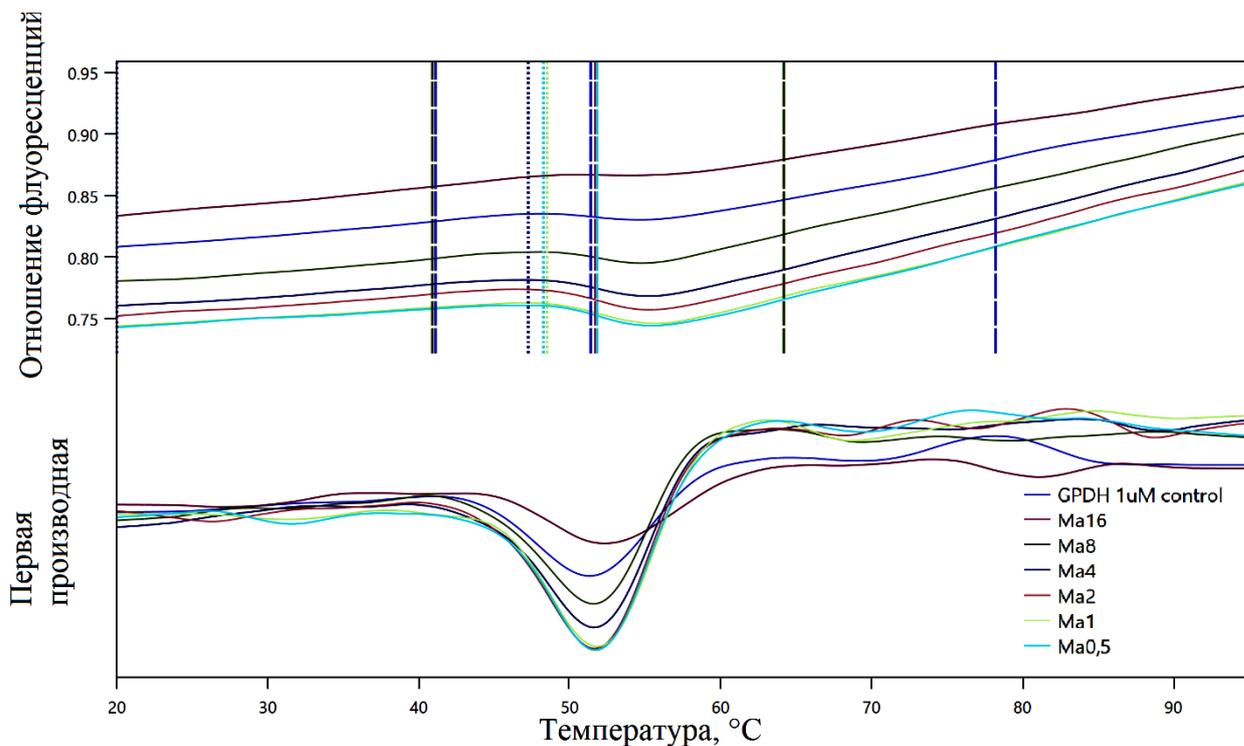


Рисунок 4.5 – Кривые плавления глицерофосфатдегидрогеназы в комплексе с малатом в различной концентрации

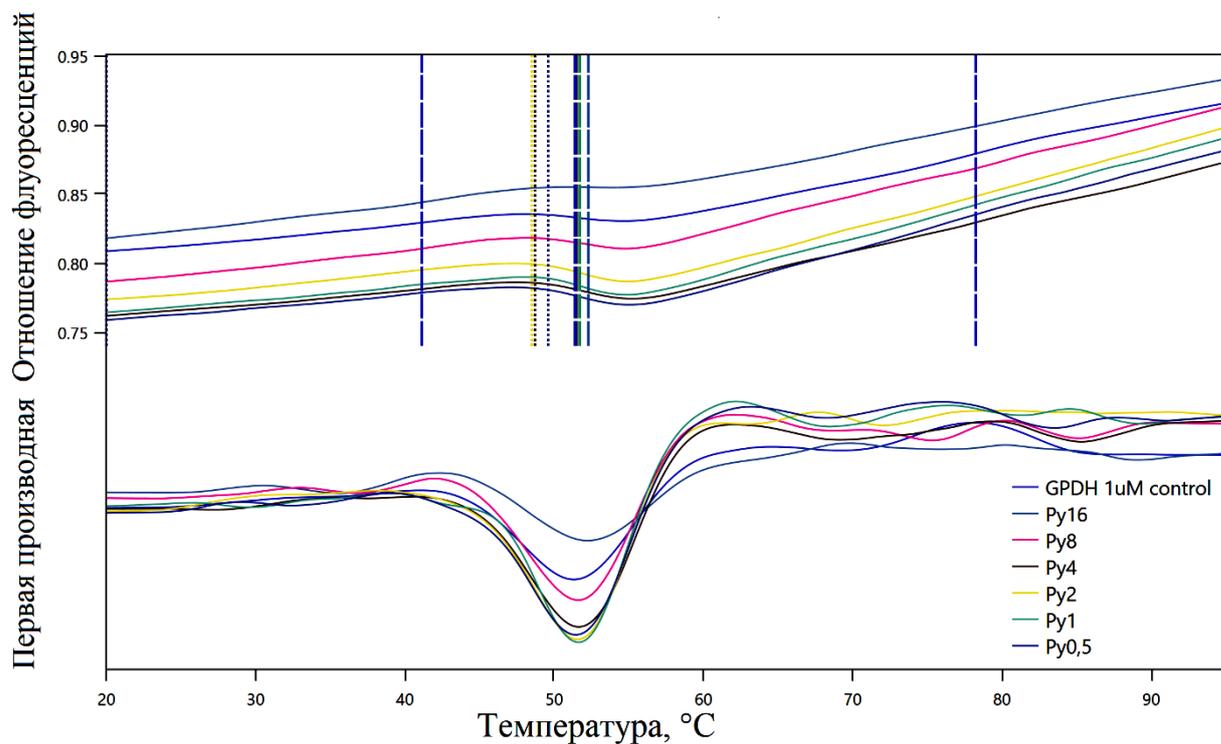


Рисунок 4.6 – Кривые плавления глицерофосфатдегидрогеназы в комплексе с пируватом в различной концентрации

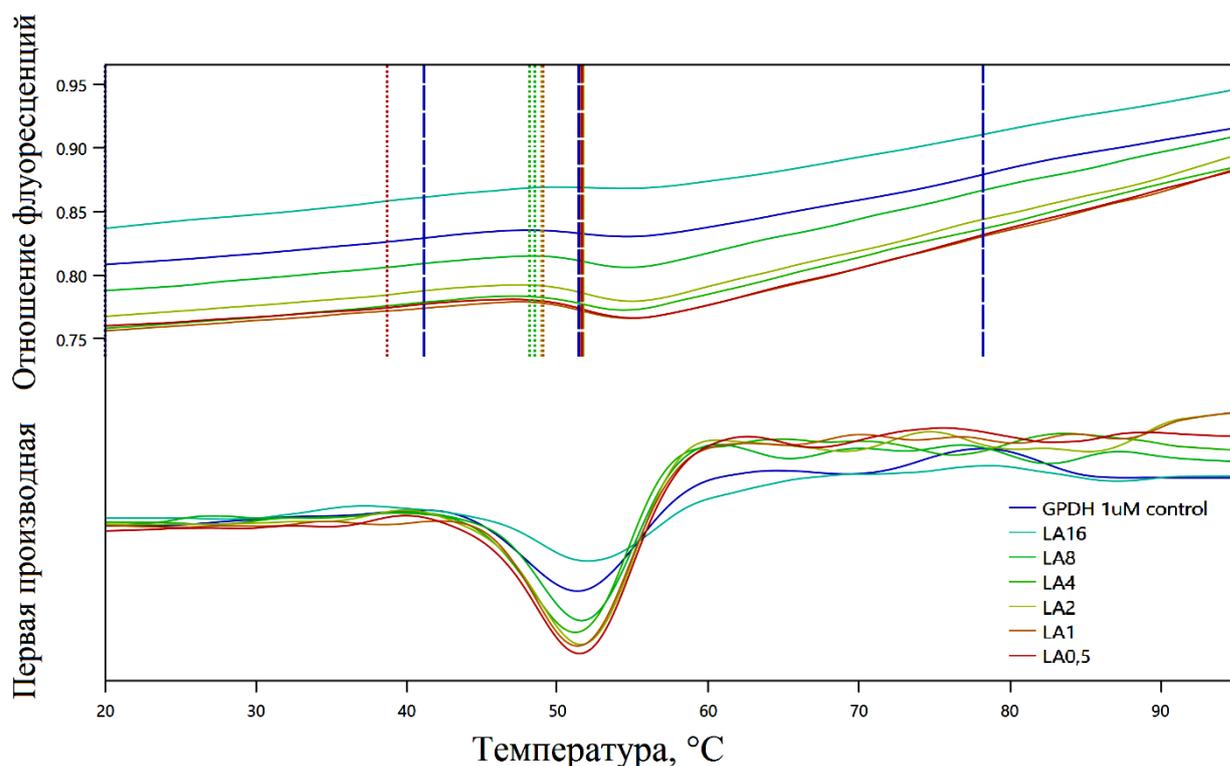


Рисунок 4.7 – Кривые плавления глицерофосфатдегидрогеназы в комплексе с лактатом в различной концентрации

На рисунках 4.8 и 4.9 представлены графики первых производных полученных кривых для концентраций, изучаемых лигандов в конечной концентрации 16 мкМ, и 0,5мкМ при постоянной концентрации глицерофосфатдегидрогеназы 1 мкМ.

Термостабильность молекулы изменяется под влиянием различных концентраций изучаемых биологически активных соединений, что отображается в изменении глубины образованных пиков на кривой первой производной. Высокие концентрации малых молекул (16 мкМ) снижают термостабильность фермента, разворачивая конформационную структуру глицерофосфатдегидрогеназы, а концентрации лигандов 0,5-2 мкМ проявляют протективное действие и переводят в наиболее выгодное каталитически активное – свернутое – состояние. Обращает на себя внимание, что данная тенденция сохраняется для всех концентраций лигандов и носит дозозависимый характер.

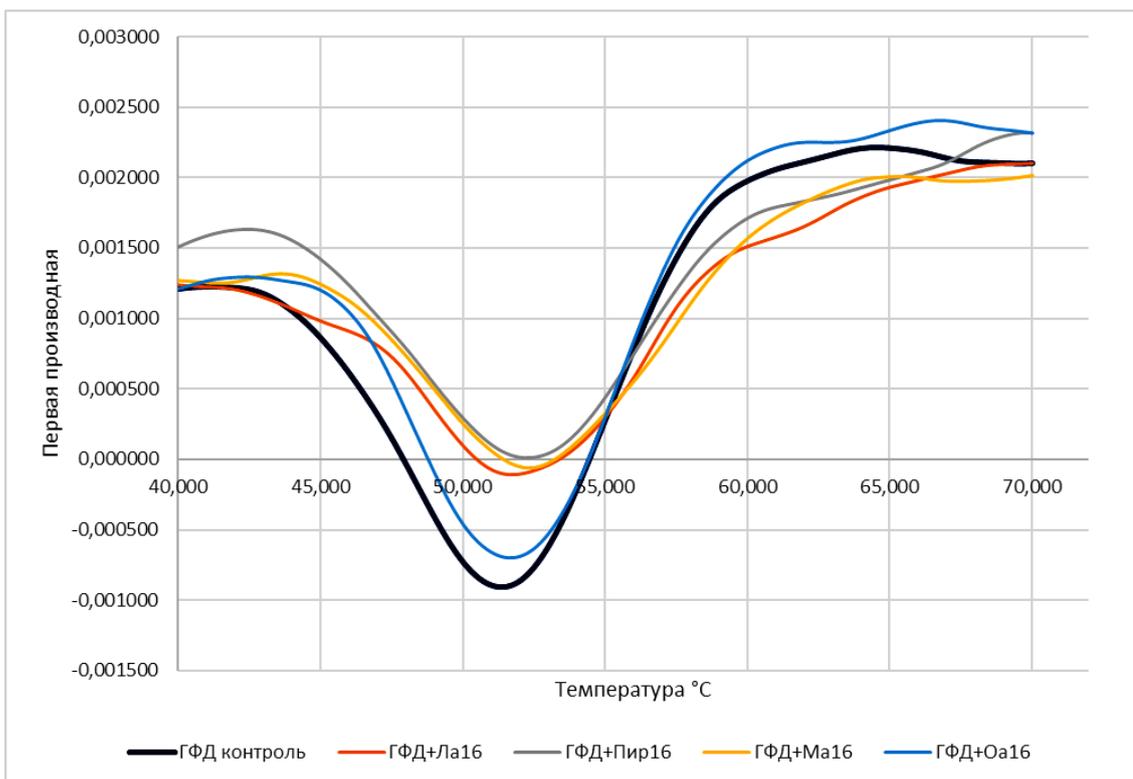


Рисунок 4.8 – Влияние оксалоацетата, пирувата, малата и лактата в конечной концентрации 16 мкМ на глицерофосфатдегидрогеназу

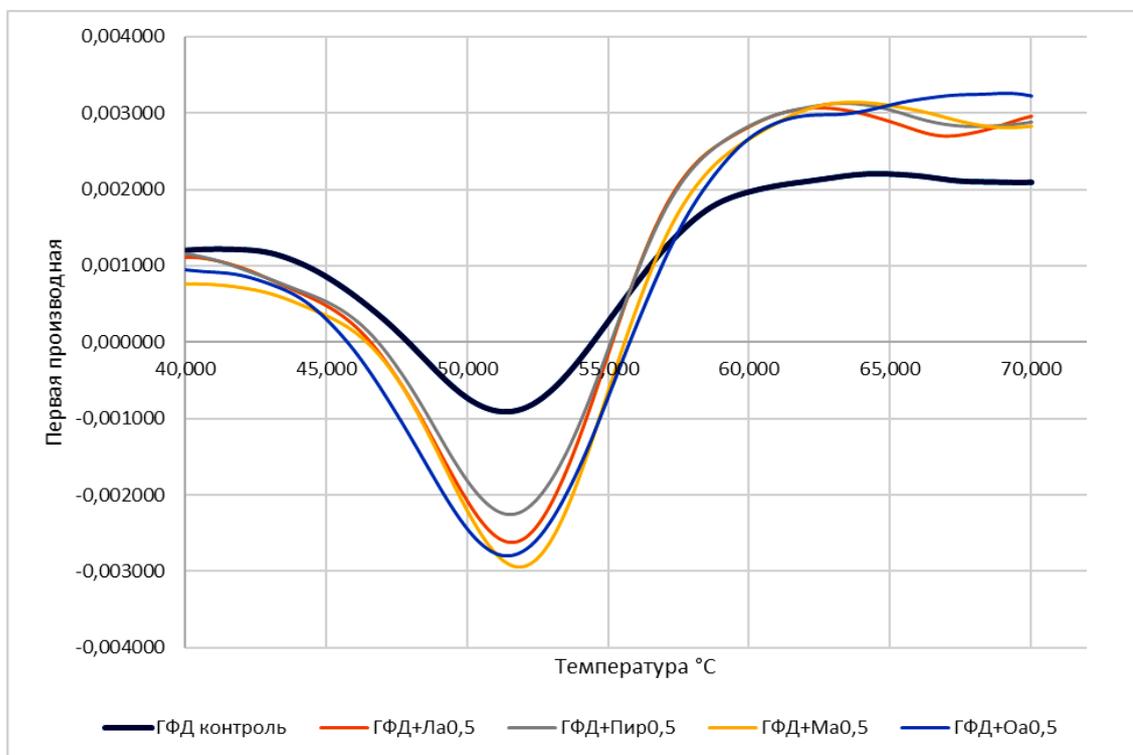


Рисунок 4.9 – Влияние оксалоацетата, пирувата, малата и лактата в конечной концентрации 0,5 мкМ на глицерофосфатдегидрогеназу

При высокой концентрации малых молекул влияние пирувата на конформацию каталитического белка максимальное, в комплексе с оксалоацетатом 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, окислительно-восстановительного партнера оксалоацетата – максимальные проявления. На графиках производных это отражается соответствующими изменениями: температура плавления белка меняется незначительно, отмечаются различные амплитуды пиков кривых контрольной и опытных проб, что свидетельствует о различном конформационном состоянии исследуемых комплексов белок-лиганд. Кроме того, мы наблюдали дозозависимый эффект исследуемых интермедиатов на молекулу глицерофосфатдегидрогеназы.

4.3. Конформационные изменения лактатдегидрогеназы при взаимодействии с пируватом, лактатом, оксалоацетатом и малатом

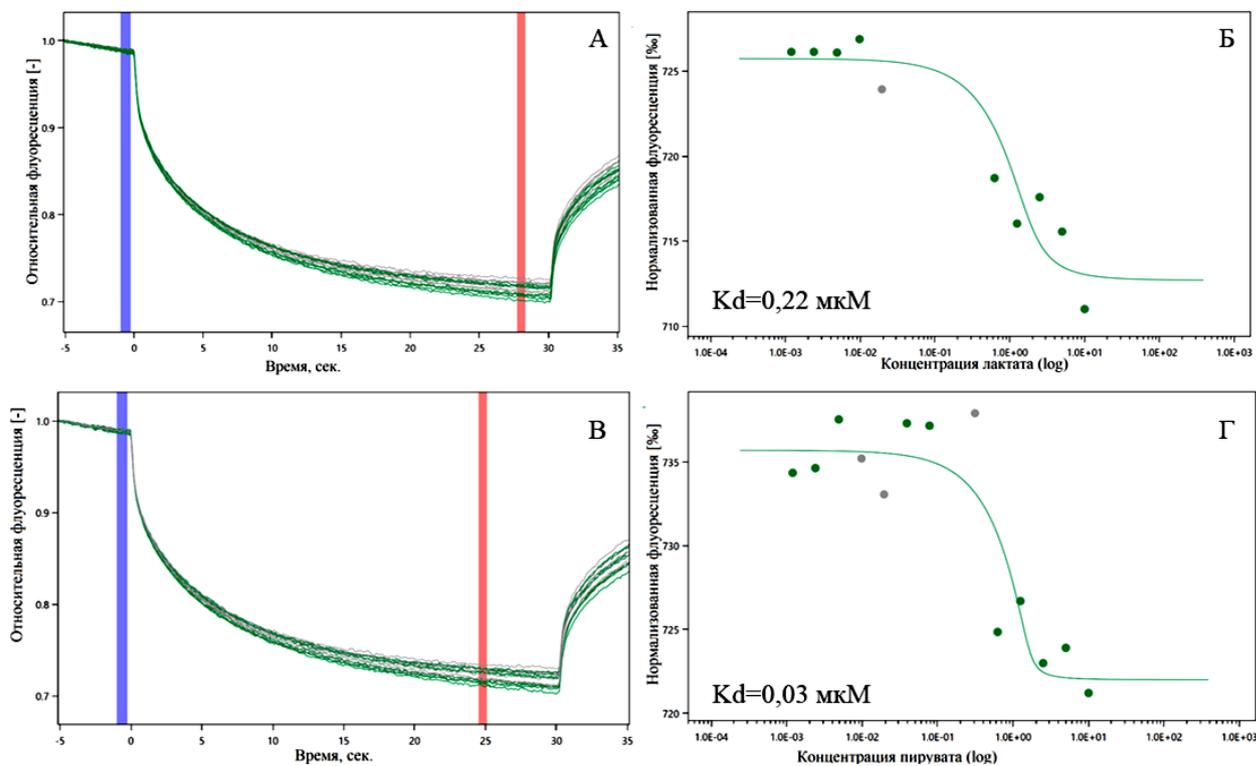
4.3.1. Метод капиллярного термофореза для установления взаимодействия лактатдегидрогеназы с пируватом, лактатом, оксалоацетатом и малатом

Феномен микротермофореза определяется движением молекул под действием температурного градиента. Движение молекул в этом градиенте зависит от их размера, заряда и гидратной оболочки. При связывании лиганда с белком-мишенью происходит изменение как минимум в одном из перечисленных параметров, что меняет термофоретическую подвижность молекулы. Для анализа белкового взаимодействия лактатдегидрогеназы с естественными интермедиатами (оксалоацетатом, пируватом, малатом, лактатом) методом микротермофореза использовались концентрации исследуемых молекул от 40 до 0,0012 мкМ, а концентрация белка оставалась

стабильной - 1,65 мкМ. Для полученной временной кривой были определены значения нормализованной флуоресценции, построены графики зависимости нормализованной флуоресценции от концентрации белка и определены равновесные константы диссоциации меченой лактатдегидрогеназы и исследуемых метаболитов.

На рисунке 4.10 представлены графики, иллюстрирующие факт взаимодействия между лактатдегидрогеназой и малыми молекулами.

Проведенное исследование показало различное сродство метаболитов к молекуле фермента. Константы диссоциации лактатдегидрогеназы составила 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.



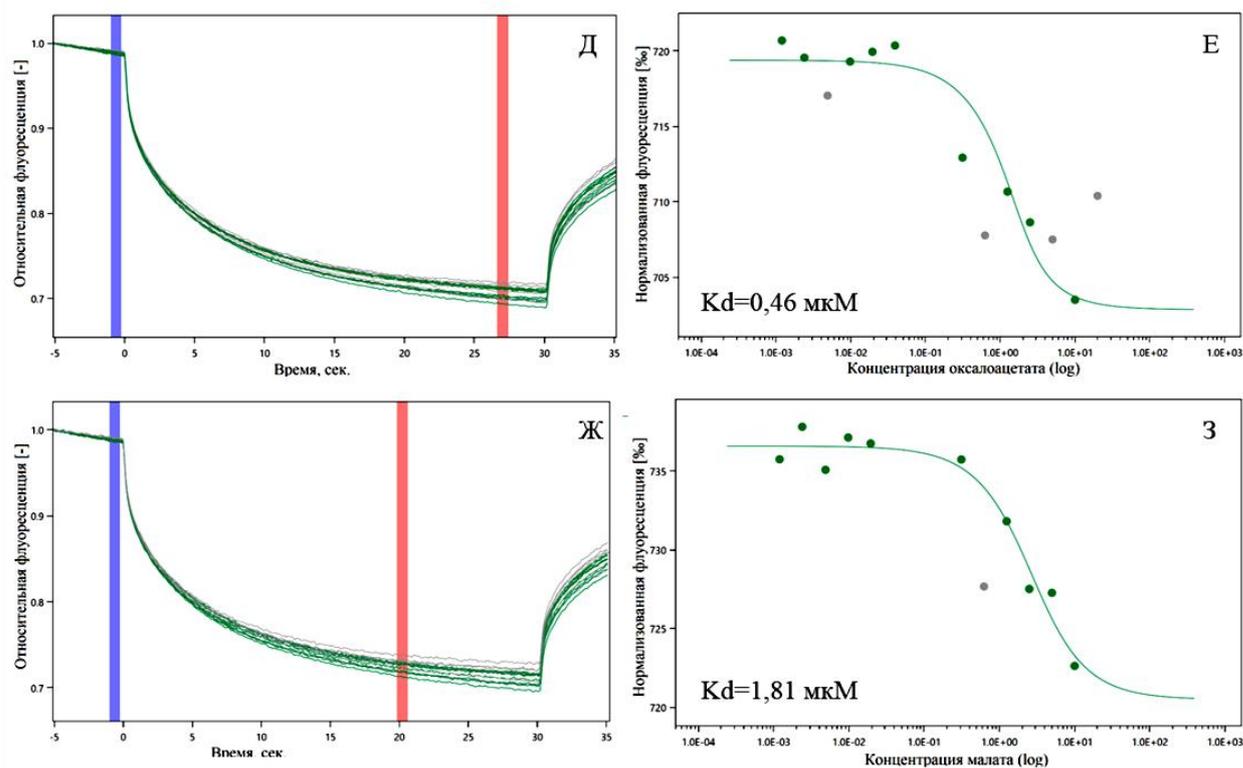


Рисунок 4.10 – Взаимодействие лактатдегидрогеназы с лактатом (А, Б), пируватом (В, Г), оксалоацетатом (Д, Е) и малатом (Ж, З).

4.3.2. Изучение термоллабильности лактатдегидрогеназы под влиянием пирувата, лактата, оксалоацетата и малата

Методом дифференциальной сканирующей флуориметрии могут быть выявлены конформационные изменения белковой молекулы фермента. Данная методика позволяет определить температуру плавления белка, точку температурного перегиба и некоторые другие параметры процесса. Определение конформационной устойчивости лактатдегидрогеназы при взаимодействии с различными концентрациями оксалоацетата, малата, пирувата, лактата выявило следующие особенности.

В таблице 4.5 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 4.5 – Температура начала плавления и точки температурного перегиба лактатдегидрогеназы при добавлении естественных интермедиатов в различных концентрациях

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: T начала плавления = 50,5°C, T 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 - 8 мкМ вызывают повышение температуры плавления лактатдегидрогеназы, а оксалоацетат, пируват, малат и лактат в концентрации 16 мкМ приводят к снижению температуры в сравнении с контрольным значением и как следствие, термодинамической стабильности белка.

На рисунках 4.11 и 4.12 представлены графики первых производных для изучаемых лигандов в конечной концентрации 16 мкМ, и 0,5мкМ при постоянной концентрации лактатдегидрогеназы 1 мкМ.

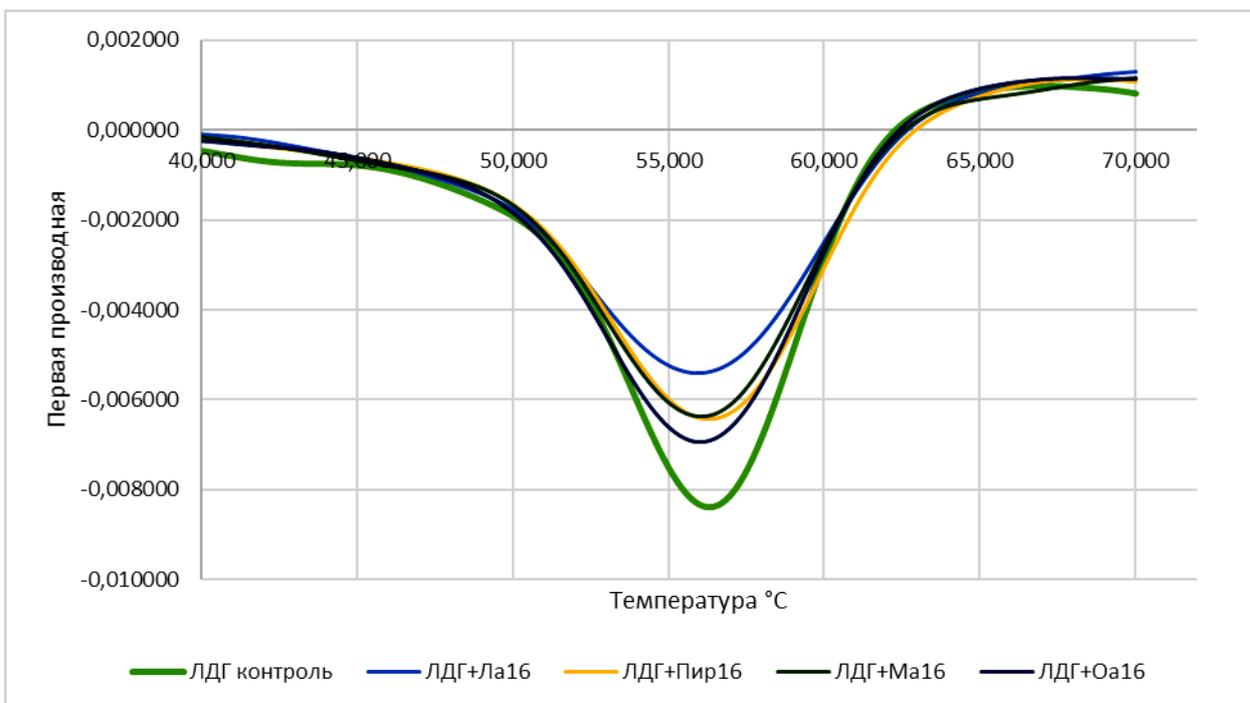


Рисунок 4.11 – Влияние оксалоацетата, пирувата, малата и лактата в конечной концентрации 16 мкМ на лактатдегидрогеназу

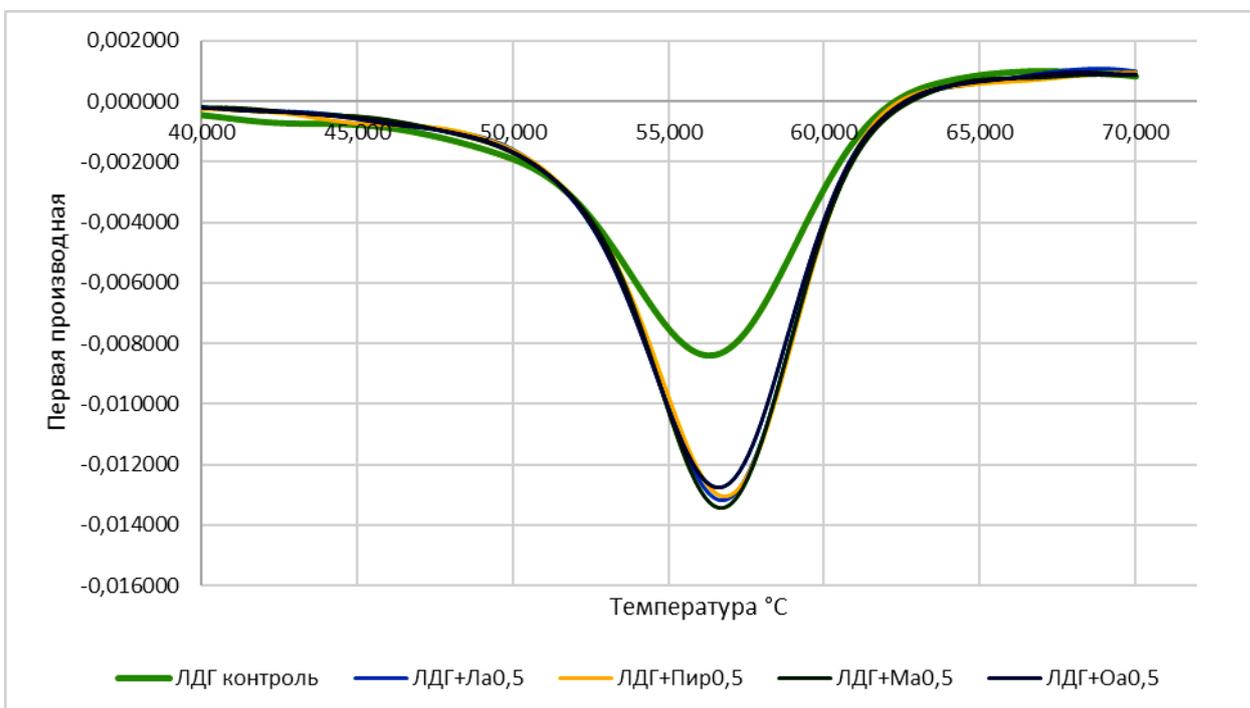


Рисунок 4.12 – Влияние естественных интермедиатов (оксалоацетата, пирувата, малата и лактата) в конечной концентрации 0,5 мкМ на лактатдегидрогеназу

Проведенный эксперимент демонстрирует что, изменялась общая амплитуда сигнала флуоресценции в процессе нагревания фермента. Каталитический белок, находящийся в растворе, может одновременно находиться в свернутом, и в частично развернутом состоянии, действие высоких температур приводят к изменению микроокружения белка, в том числе конформационной перестройке ароматических остатков, следствием чего является изменение упорядоченной структуры белка, его разворачивание.

Нами было проанализировано влияние различных концентраций исследуемых метаболитов на соотношение флуоресценций лактатдегидрогеназы (350/330 нм) в физиологическом диапазоне температур 36,5-37,5 °С (таблица 4.6, 4.7). Проводили сравнение пар лигандов пируват-оксалоацетат и лактат-малат. В таблице 4.6 представлены данные по влиянию пирувата и оксалоацетата в диапазоне концентраций на лактатдегидрогеназу.

Таблица 4.6 – Влияние пирувата и оксалоацетата на соотношение флуоресценции (350/330 нм) лактатдегидрогеназы в физиологическом диапазоне температур

Концентрация лиганда, мкМ	Пируват M±SD	Оксалоацетат M±SD
Контроль	0,818±0,0011	0,818±0,0011
0,5	0,809±0,0013*	0,806±0,0009*
1	0,814±0,0012	0,809±0,0013*
2	0,812±0,0009*	0,810±0,0011*
4	0,813±0,0011*	0,811±0,0012*
8	0,818±0,0014*	0,814±0,0012*
16	0,825±0,0017*	0,821±0,0018*

* Сравнения лигандов $p < 0,001$

При сравнении попарных различных концентраций лигандов на соотношение флуоресценций было выявлено, что при добавлении пирувата в концентрациях 1 мкМ и 4 мкМ - неразличимы статистически, остальные пары концентраций высокозначимо различаются друг от друга. При добавлении оксалоацетата в концентрациях 2 мкМ и 4 мкМ - неразличимы статистически, остальные пары концентраций высокозначимо различаются друг от друга.

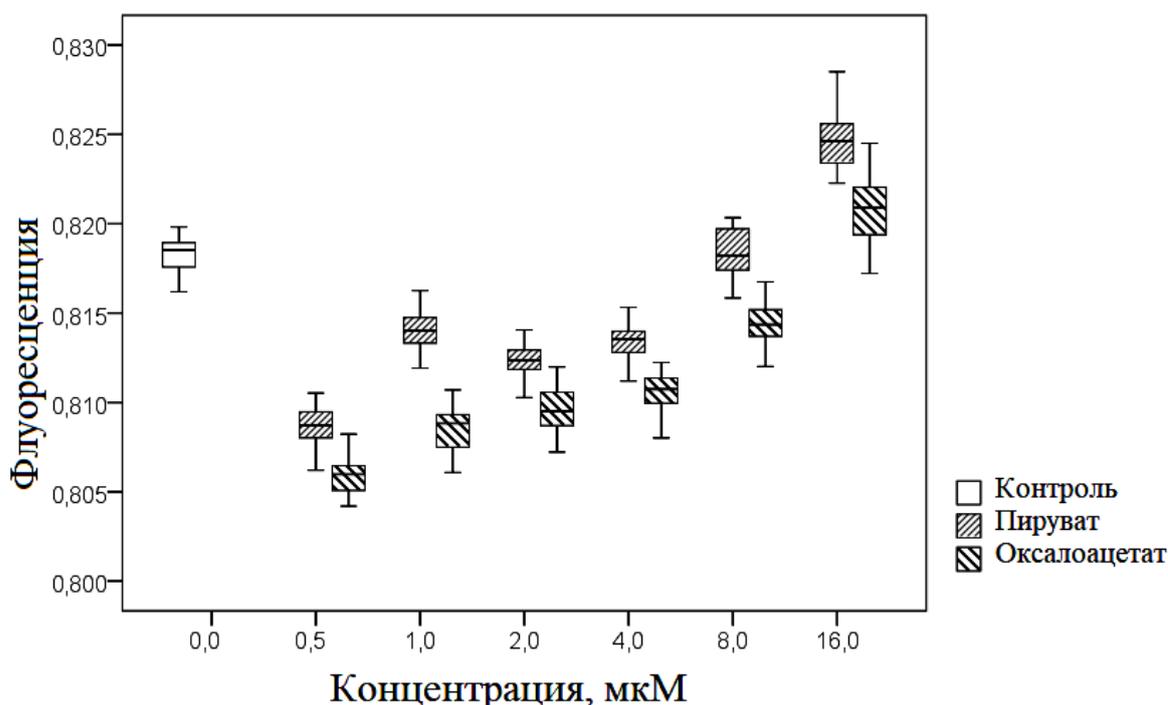


Рисунок 4.13 – Влияние различных концентраций пирувата и оксалоацетата на лактатдегидрогеназу в физиологическом диапазоне температур

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 (рисунок 4.13). При этом наиболее выраженный эффект оказывают изучаемые малые молекулы в конечной концентрации 0,5 мкМ. Пируват в концентрации 8 мкМ не изменяет соотношение флуоресценции, а оксалоацетат снижает этот показатель до $0,814 \pm 0,0012$ ($p < 0,001$) по сравнению с контролем

0,818±0,0011. Для обоих лигандов в концентрации 16 мкМ соотношения флуоресценции существенно выше контроля: 0,825±0,0017 для пирувата и 0,821±0,0018 для оксалоацетата ($p<0,001$). При всех изученных концентрациях естественных метаболитов более высокие значения соотношения флуоресценции выявлены для пирувата, чем для оксалоацетата ($p<0,001$). Далее мы изучили влияние различных концентраций лактата и малата на соотношение флуоресценций лактатдегидрогеназы (350/330 нм) в физиологическом диапазоне температур (36,5-37,5 °C) (таблица 4.7).

При анализе попарных межгрупповых сравнений различных концентраций метаболитов было выявлено: для лактата неразличимы соотношения флуоресценций 1-2 мкМ, 1-4 мкМ, 2-4 мкМ. для малата неразличимы воздействия при концентрациях 0,5–2 мкМ, 0,5–4 мкМ, 2–4 мкМ.

Таблица 4.7 – Влияние лактата и малата на соотношение флуоресценция (350/330 нм) лактатдегидрогеназы в физиологическом диапазоне температур 36,5-37,5 °C

Концентрация лиганда, мкМ	Лактат, M±SD	Малат, M±SD
Контроль	0,818±0,0011	0,818±0,0011
0,5	0,814±0,0014*	0,808±0,0012*
1	0,816±0,0011*	0,805±0,0006*
2	0,816±0,0014*	0,809±0,0015*
4	0,817±0,0014*	0,809±0,0014*
8	0,818±0,0012*	0,813±0,0013*
16	0,829±0,0016*	0,821±0,0013*

* Сравнения лигандов $p<0,001$

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). По мере роста концентрации лиганда различия с контролем уменьшаются. В концентрации лактата 8 мкМ отличия с контролем исчезают ($p = 0,660$), в этой же концентрации малат по прежнему способствует снижению соотношений флуоресценции по сравнению с контролем ($p < 0,001$). 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 (рисунок 4.14).

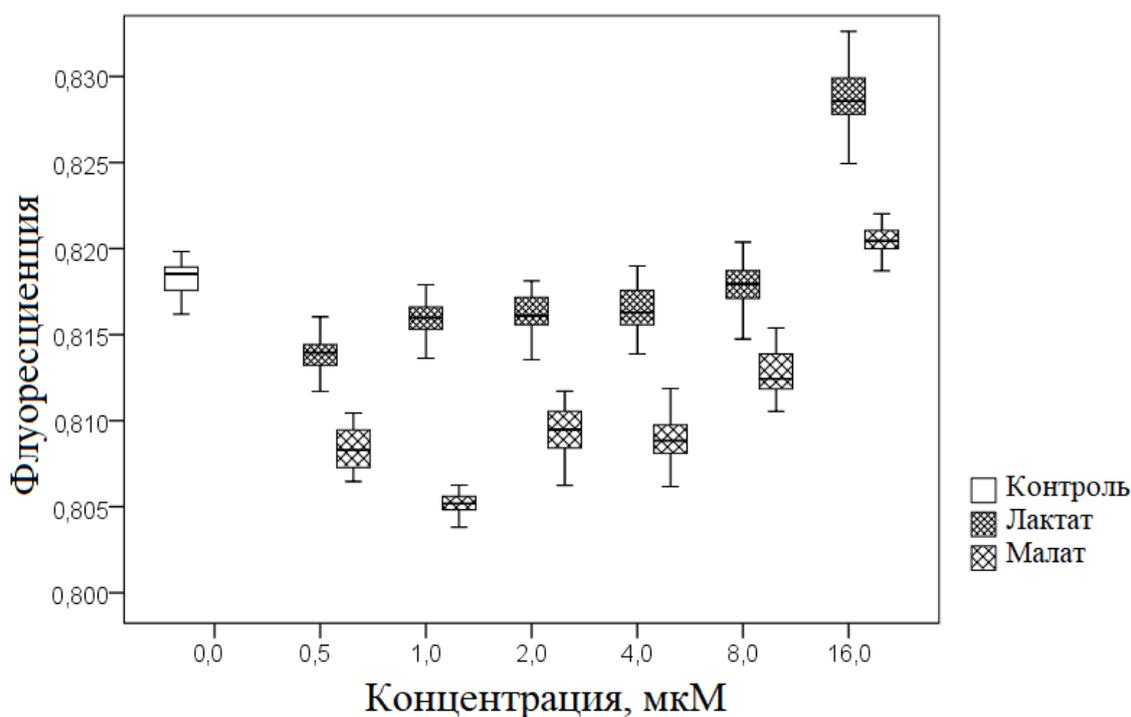


Рисунок 4.14 – Влияние различных концентраций лактата и малата на лактатдегидрогеназу в физиологическом диапазоне температур

Является известным, что лактатдегидрогеназа находится на развилке путей углеводного обмена, направляя потоки пирувата в анаэробный или

аэробный гликолиз. Это обеспечивается благодаря наличию у лактатдегидрогеназы в том числе саморегуляции, которая подвержена как внешним регуляторным факторам, так и наличию различных конформеров фермента, обладающих разным сродством к субстрату. Повышение содержания белка лактатдегидрогеназы или лактата в растворе увеличивает долю тетрамеров фермента, что позволяет сделать предположение о роли тетрамерной конформации в окислении лактата, а димерной формы лактатдегидрогеназы – в восстановлении пирувата [Ю.В. Зимин с соавт., 2001].

Влияние биологически активных соединений на сдвиг точки плавления различается в области низких концентраций (0,5 и 1 мкМ) и высоких (16мкМ). В малых концентрациях метаболиты вызывают большее повышение температуры плавления, чем при высокой концентрации, при которой происходит снижение температуры перегиба. Высокое содержание метаболитов в образце приводит к развернутой конформации молекулы фермента, что выражается в снижении его термостабильности. Добавление изучаемых малых молекул в минимальной концентрации опосредуют сворачивание белковой молекулы, что приводит к повышению термодинамической стабильности глицерофосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы. По данным литературы, изменение температуры плавления белка при подборе различных концентраций молекул редко превосходит 4°C, а степень изменения пропорциональна аффинитету связи между белком и лигандом. Методы химического скрининга являются актуальными и перспективными для выявления малых молекул, способствующих стабилизации, кристаллизации белка, а также определению его структуры [M. Vedadi et al., 2006].

Данное исследование посвящено изучению взаимодействия малых молекул, переключателей обменов – оксалоацетата, малата, лактата и пирувата с каталитическими белками глицерофосфатдегидрогеназой и

лактатдегидрогеназой. Методами дифференциальной сканирующей флуориметрии и микрокапиллярного термофореза был установлен факт взаимодействия и показано наличие изменения конформационной стабильности ферментов при воздействии на них биологически активными соединениями. Также, нами было установлено, что малые концентрации метаболитов обладают протекторным действием на структуру молекулы белка, увеличивая устойчивость белка к влиянию температуры, а высокие концентрации, напротив, приводят к снижению конформационной стабильности. Следующим этапом нашего исследования стало изучение влияния естественных метаболитов на каталитическую функцию глицерофосфатдегидрогеназной, лактатдегидрогеназной, малатдегидрогеназной систем.

ГЛАВА V.

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНЫХ СИСТЕМ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ ЗОНДИРОВАНИИ МАЛЫМИ МОЛЕКУЛАМИ

Межмолекулярные взаимодействия белков играют центральную роль в определении их функций в биологических системах. Фермент-субстратное связывание является одним из разновидностей этих взаимодействий, которое имеет ключевое значение в регуляторных, метаболических и сигнальных путях. Одним из наиболее важных свойств связывания фермента с субстратом является высокая специфичность. В белковой молекуле находятся остатки, определяющие специфичность субстрата, которые позволяют различным ферментам распознавать свои уникальные субстраты. Скоординированное действие консервативных и неконсервативных остатков определяет ферментативную активность и специфичность.

Семейство L-лактатдегидрогеназ включает лактатдегидрогеназу (ЕС 1.1.1.27) и малатдегидрогеназу (ЕС 1.1.1.37). Они структурно схожи и оба используют один и тот же кофермент для каталитического окислительно-восстановительного взаимопревращения с помощью сходных механизмов. Экспериментально подтверждено, что в положении 86 остатки R и Q являются консенсусными для лактатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы, соответственно, и ответственны за специфичность связывания субстрата. Одна замена остатка в этом положении способна переключать специфичность фермента [G.X. Yu et al., 2005].

Другим каталитическим белком для исследования была глицерофосфатдегидрогеназа (ЕС 1.1.1.8). По данным кристаллографии, фермент содержит два мономера, которые образуют плотно упакованный димер с некристаллографической 2-кратной осью без существенных различий между субъединицами. Взаимодействия мономер-мономер в

основном гидрофобны. Между мономерами обнаружено 25 водородных связей [Х. Оу, 2006].

Убедившись, что малые молекулы влияют на изолированные каталитические белки, следующим этапом нашей работы была серия экспериментов по определению функционирования фермент-субстратных систем глицерофосфатдегидрогеназной и лактатдегидрогеназной, а также системы ферментов малатдегидрогеназа-лактатдегидрогеназа под влиянием биологически активных соединений пирувата, лактата, оксалоацетата, малата.

5.1. Влияние малых молекул на функциональную активность глицерофосфатдегидрогеназы

Мы провели серию экспериментов по изучению влияния различных концентраций оксалоацетата, малата, пирувата, лактата на работу глицерофосфатдегидрогеназной системы (таблица 5.1).

При анализе полученных данных обращает на себя внимание, что малат с высокой степенью достоверности в различных концентрациях снижает активность глицерофосфатдегидрогеназной системы. Контрольное значение составило $0,047 \pm 0,001$ Е/мг белка, при добавлении малата в конечной концентрации 1 мМ $0,031 \pm 0,0007$ Е/мг белка ($p=0,0002$), 0,1 мМ $0,04 \pm 0,0004$ Е/мг белка ($p=0,0391$), 10 мкМ $0,036 \pm 0,0003$ Е/мг белка ($p=0,0061$), 1 мкМ $0,036 \pm 0,0003$ Е/мг белка ($p=0,0005$).

При введении лактата в фермент-субстратную систему, отмечается, что 0,1 мМ, 10 мкМ ($p=0,0006$), 1 мкМ ($p=0,0008$) концентрации лиганда с высокой степенью достоверности снижают активность глицерофосфатдегидрогеназы, а 1 мМ концентрация повышает ее.

Таблица 5.1 – Влияние малых молекул на активность глицерофосфатдегидрогеназы

n=10		Активность глицерофосфатдегидрогеназы M±m	
		Е/мл	Е/мг белка
Контроль		1,2 ± 0,02	0,047 ± 0,001
95% ДИ		1,08 - 1,29	0,04 - 0,05
1 мМ	Пируват	1,24 ± 0,12	0,049 ± 0,005
	95% ДИ	0,74 - 1,75	0,03 - 0,069
	Достоверность	0,6545	
	Лактат	1,23 ± 0,015	0,048 ± 0,0006
	95% ДИ	1,17 - 1,30	0,046 - 0,051
	Достоверность	0,1781	
	Оксалоацетат	1,23 ± 0,05	0,048 ± 0,002
	95% ДИ	1,00 - 1,46	0,04 - 0,057
	Достоверность	0,4924	
	Малат	0,8 ± 0,02	0,031 ± 0,0007
	95% ДИ	0,71 - 0,87	0,028 - 0,034
	Достоверность	0,0002	
	р П-Л	0,9279	
	р ОА-МА	0,0015	
0,1 мМ	Пируват	1,3 ± 0,2	0,05 ± 0,008
	95% ДИ	0,42 - 2,24	0,017 - 0,088
	Достоверность	0,5279	
	Лактат	1 ± 0,06	0,04 ± 0,003
	95% ДИ	0,76 - 1,31	0,03 - 0,052
	Достоверность	0,0937	
	Оксалоацетат	1,0 ± 0,08	0,04 ± 0,003
	95% ДИ	0,71 - 1,38	0,028 - 0,054
	Достоверность	0,1594	
	Малат	1,1 ± 0,01	0,04 ± 0,0004
	95% ДИ	1,06 - 1,15	0,04 - 0,045
	Достоверность	0,0391	
	р П-Л	0,2517	
	р ОА-МА	0,4822	
10 мкМ	Пируват	1,14 ± 0,2	0,045 ± 0,009
	95% ДИ	0,19 - 2,09	0,007 - 0,082
	Достоверность	0,8460	
	Лактат	0,92 ± 0,01	0,036 ± 0,0004
	95% ДИ	0,87 - 0,97	0,034 - 0,038

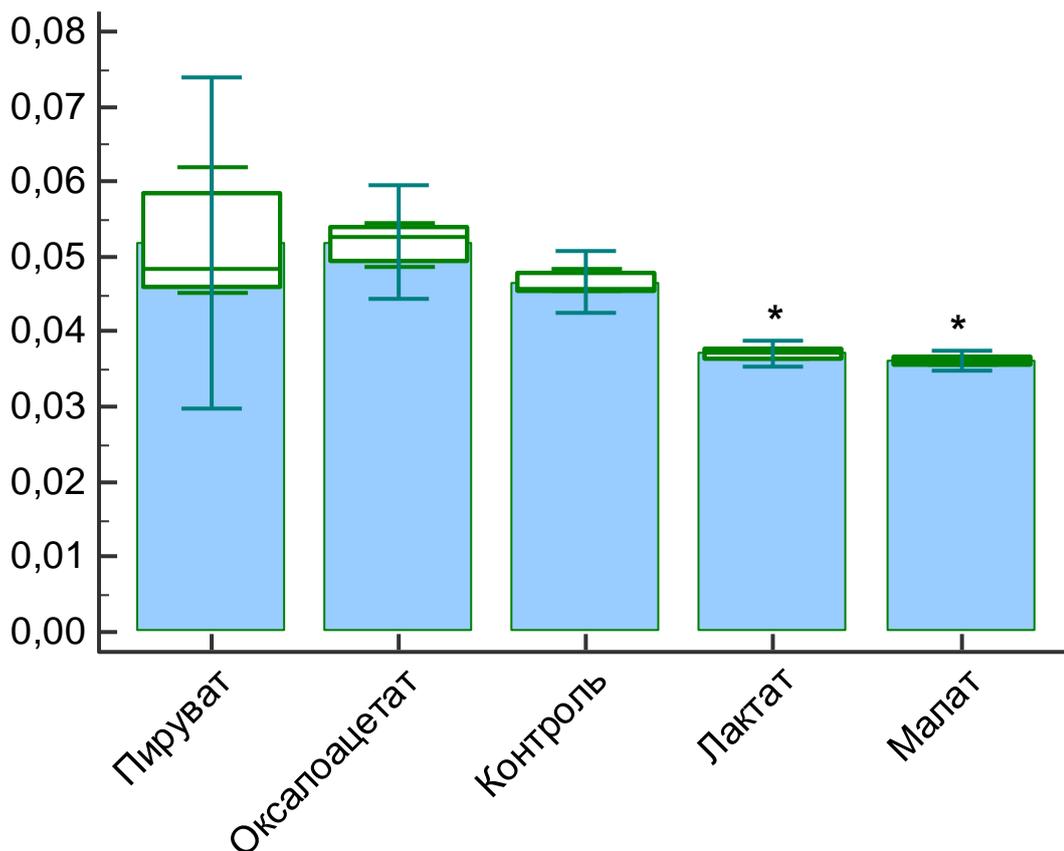
	Достоверность	0,0006	
	Оксалоацетат	0,95 ± 0,04	0,037 ± 0,001
	95% ДИ	0,80 - 1,11	0,031- 0,044
	Достоверность	0,0058	
	Малат	0,84 ± 0,06	0,033 ± 0,002
	95% ДИ	0,58 - 1,10	0,023 - 0,043
	Достоверность	0,0061	
	р П-Л	0,3803	
	р ОА-МА	0,1886	
1 мкМ	Пируват	1,32 ± 0,1	0,05 ± 0,005
	95% ДИ	0,76 - 1,88	0,03 - 0,074
	Достоверность	0,3739	
	Лактат	0,94 ± 0,01	0,037 ± 0,0004
	95% ДИ	0,90 - 0,99	0,035 - 0,039
	Достоверность	0,0008	
	Оксалоацетат	1,32 ± 0,05	0,052 ± 0,002
	95% ДИ	1,13 - 1,51	0,044 - 0,059
	Достоверность	0,0579	
	Малат	0,92 ± 0,008	0,036 ± 0,0003
	95% ДИ	0,88 - 0,99	0,035 - 0,038
	Достоверность	0,0005	
	р П-Л	0,0463	
р ОА-МА	0,0009		

При инкубации с пируватом наблюдается обратное действие. Конечные концентрации метаболита 1 мМ, 0,1 мМ, 1 мкМ повышают активность фермента, а 10 мкМ пируват обладает ингибирующим действием.

Оксалоацетат в концентрации 1 мМ и 1 мкМ обладает активирующим влиянием, а концентрации лиганда 0,1 мМ и 10 мкМ ($p=0,0058$), наоборот снижают активность фермента.

Интересным является наблюдение, что биологически активные соединения в конечной концентрации 1 мкМ по-разному влияют на фермент-субстратное взаимодействие. Так, гидроксикислоты малат ($p=0,0005$) и лактат ($p=0,0008$) с высокой степенью достоверности обладают ингибирующим действием на глицерофосфатдегидрогеназу, удельная активность составила 0,036 Е/мг белка и 0,037 Е/мг белка соответственно

(рисунок 5.1). Пара кетокислот оксалоацетат – пируват, наоборот увеличивают активность фермента, действуя активирующе на глицерофосфатдегидрогеназную систему. Удельная активность составила 0,052 Е/мг белка для оксалоацетата и 0,05 Е/мг белка для пирувата. Дозозависимое влияние малых молекул на глицерофосфатдегидрогеназную систему не наблюдается.



* $p < 0,001$

Оксалоацетат - малат $p = 0,0009$

Рисунок 5.1 – Влияние малых молекул в конечной концентрации 1 мкМ на активность глицерофосфатдегидрогеназы

При межгрупповом сравнении критерия Стьюдента окислительно-восстановительных партнеров оксалоацетат – малат обращает на себя внимание, что эффекты этих лигандов разнонаправленные: оксалоацетат в

конечных концентрациях 1 мМ и 1 мкМ активирует активность глицерофосфатдегидрогеназы, а малат в концентрациях 1 мМ ($p=0,0002$) и 1 мкМ ($p=0,0005$) обладают ингибирующим действием. Их действия достоверно различимы: при концентрации 1 мМ достоверность межгруппового сравнения пары оксалоацетат – малат равна 0,0015, а при концентрации 1 мкМ 0,0009, причем действие малата достоверно значимо.

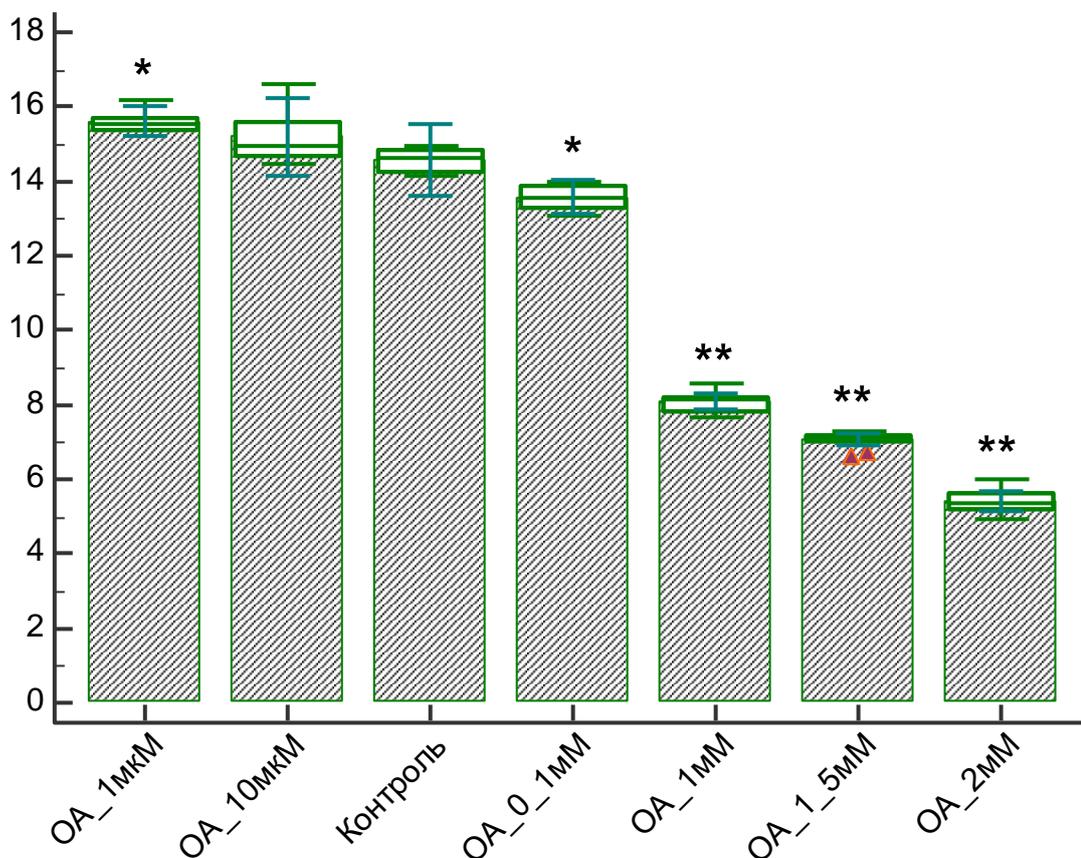
Как известно, глицерофосфатдегидрогеназа в присутствии НАД и дигидроксиацетофосфата принимает закрытую конформацию, в которой два домена образуют множественные контакты. Вероятно, инкубация с биологически активными соединениями – гидроксикислотами - лактатом и малатом в концентрации 1 мкМ изменяет конформационную структуру белковой молекулы, разворачивая молекулу, что приводит к удалению активных участков каталитического центра для образования фермент-субстратного комплекса, и как следствие проявляется ингибирующее действие лигандов.

Увеличение же каталитической активности глицерофосфатдегидрогеназы в основном связано со стабилизацией переходного состояния электростатическими взаимодействиями с полярными аминокислотными боковыми цепями и тем, что эти сильные связывающие взаимодействия требуют высокой степени организации аминокислотных боковых цепей в активном сайте фермента [L.S. Mydy et al., 2019].

5.2. Влияние биологически активных соединений на действие лактатдегидрогеназной системы

Мы провели серию экспериментов по изучению влияния различных концентраций оксалоацетата и малата на функцию лактатдегидрогеназной системы. Так как изучаемые метаболиты пируват и лактат являются субстратами лактатдегидрогеназы, то их мы не включили в этот эксперимент. Активность фермента оценивали в прямой и обратной реакциях (таблица

5.2). Обращает на себя внимание дозозависимое воздействие изучаемых соединений на активность лактатдегидрогеназной системы (рисунок 5.2, 5.3).

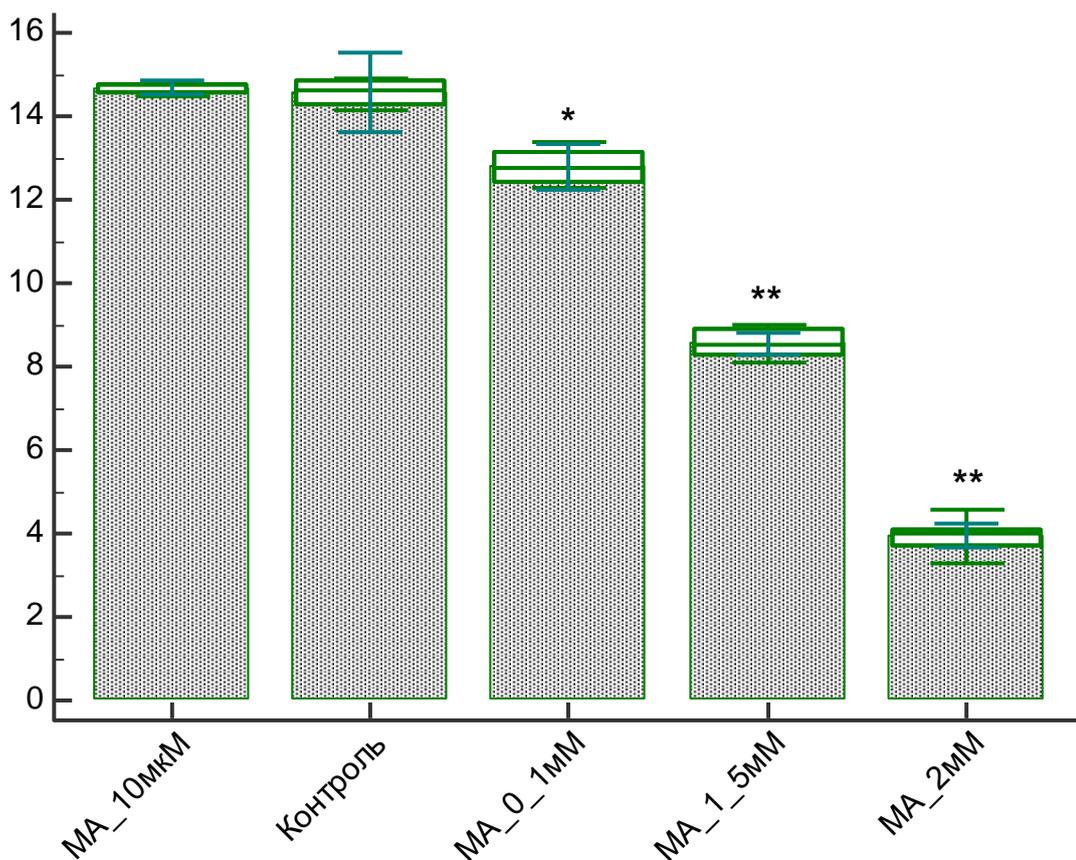


* $p < 0,01$, ** $p < 0,0001$

Рисунок 5.2 – Влияние оксалоацетата на активность лактатдегидрогеназы (пируват-лактат)

При инкубации лактатдегидрогеназы с оксалоацетатом и малатом в диапазоне достаточно низких концентраций - 1 мкМ и 10 мкМ происходило увеличение активности фермента. Оксалоацетат в конечной концентрации 1 мкМ ($p=0,0061$) достоверно увеличивает активность фермента ($15,6 \pm 0,14$ Е/мг белка), по сравнению с контрольной пробой ($14,56 \pm 0,22$ Е/мг белка). Статистическая значимость попарных межгрупповых сравнений влияния малата и оксалоацетата на лактатдегидрогеназу в прямой реакции в конечной концентрации 1 мкМ составила $<0,0001$. Вместе с тем, добавление этих же

концентраций биологически активных соединений при постановке обратной реакции не оказало активирующего эффекта, а наоборот активность фермента тормозилась. Стоит отметить, что малат в конечной концентрации 1 мкМ в прямой ($p=0,0008$) и обратной реакциях обладают ингибирующим действием. При межгрупповом сравнении пар метаболитов влияние малата статистически значимо.



* $p<0,01$, ** $p<0,0001$

Рисунок 5.3 – Влияние малата на активность лактатдегидрогеназы (пируват-лактат)

Малат и оксалоацетат в концентрации 10 мкМ так же обладают активирующим действием на лактатдегидрогеназную систему. Оксалоацетат в прямой и обратной реакциях увеличивает активность фермента. Удельная активность в обратной реакции лактатдегидрогеназы при инкубации с

оксалоацетатом составила $2,98 \pm 0,07$ Е/мг белка по сравнению с контрольным значением $2,96 \pm 0,1$ Е/мг белка, в прямой реакции активность фермента увеличилась на 5% и составила $15,2 \pm 0,38$ Е/мг белка, а контроль $14,56 \pm 0,22$ Е/мг белка.

Таблица 5.2 – Влияние малата и оксалоацетата на активность лактатдегидрогеназы

n=11		Прямая реакция Пируват-Лактат M±m		Обратная реакция Лактат-Пируват M±m	
		Е/л	Е/мг белка	Е/л	Е/мг белка
Контроль		94,67 ± 1,45	14,56±0,22	19,23±0,67	2,96±0,1
95% ДИ		88,42-100,92	13,60-15,53	16,35 - 22,11	2,52- 3,40
1 мкМ	Малат	85 ± 0,84	13 ± 0,13	18,2 ± 0,25	2,8 ± 0,04
	95% ДИ	82,68 - 87,32	12,72-13,43	17,51 -18,89	2,69- 2,91
	Достоверность	0,0008		0,1309	
	Оксалоацетат	101,4 ± 0,93	15,6 ± 0,14	18,54 ± 0,14	2,85 ± 0,02
	95% ДИ	98,83-103,97	15,20-15,99	18,15 - 18,93	2,79 - 2,91
	Достоверность	0,0061		0,2333	
	p OA-MA	< 0,0001		0,2681	
10 мкМ	Малат	95,4 ± 0,4	14,7 ± 0,06	17,22 ± 0,25	2,65 ± 0,04
	95% ДИ	94,29 - 96,51	14,51-14,85	16,53 - 17,91	2,54 - 2,76
	Достоверность	0,5596		0,0143	
	Оксалоацетат	98,8 ± 2,44	15,2 ± 0,38	19,38 ± 0,43	2,98 ± 0,07
	95% ДИ	92,03-105,57	14,16-16,24	18,20 - 20,56	2,80 - 3,16
	Достоверность	0,2721		0,8510	
	p OA-MA	0,2059		0,0023	
0,1 мМ	Малат	83,2 ± 1,28	12,8 ± 0,2	17,1 ± 0,2	2,6 ± 0,03
	95% ДИ	79,64 - 86,76	12,25-13,35	16,54-17,58	2,55-2,70
	Достоверность	0,0013		0,0074	
	Оксалоацетат	88,2 ±1,07	13,57±0,16	17,22 ± 0,44	2,65 ± 0,07
	95% ДИ	85,24 -91,16	13,11-14,03	16,00 - 18,44	2,46 - 2,84

	Достоверность	0,0108		0,0387	
	p OA-MA	0,0171		0,7462	
1 мМ	Малат	29,0 ± 0,75	4,5 ± 0,11	4,61 ± 0,11	0,71 ± 0,018
	95% ДИ	27,37 - 30,74	4,21 - 4,73	4,35 - 4,87	0,67 - 0,75
	Достоверность	< 0,0001		< 0,0001	
	Оксалоацетат	52,5 ± 0,57	8,0 ± 0,09	6,8 ± 0,084	1,01 ± 0,013
	95% ДИ	51,25 - 53,83	7,89 - 8,28	6,65 - 7,03	1,02 - 1,08
	Достоверность	< 0,0001		< 0,0001	
	p OA-MA	< 0,0001		< 0,0001	
1,5 мМ	Малат	55,6 ± 0,72	8,6 ± 0,11	5,5 ± 0,2	0,84 ± 0,03
	95% ДИ	53,99 - 57,25	8,31 - 8,81	5,01 - 5,92	0,77 - 0,91
	Достоверность	< 0,0001		< 0,0001	
	Оксалоацетат	45,9 ± 0,44	7,1 ± 0,07	8,4 ± 0,09	1,3 ± 0,014
	95% ДИ	44,85 - 46,86	6,90 - 7,21	8,22 - 8,63	1,26 - 1,33
	Достоверность	< 0,0001		< 0,0001	
	p OA-MA	< 0,0001		< 0,0001	
2 мМ	Малат	25,7 ± 0,82	3,95 ± 0,13	2,44 ± 0,13	0,38 ± 0,02
	95% ДИ	23,83 - 27,53	3,67 - 4,23	2,14 - 2,74	0,33 - 0,42
	Достоверность	< 0,0001		< 0,0001	
	Оксалоацетат	35,3 ± 0,77	5,4 ± 0,12	3,1 ± 0,17	0,48 ± 0,03
	95% ДИ	33,52 - 37,01	5,16 - 5,69	2,75 - 3,54	0,42 - 0,54
	Достоверность	< 0,0001		< 0,0001	
	p OA-MA	< 0,0001		0,0050	
5 мМ	Малат/оксалоацетат	ПОЛНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ			

Стоит отметить, что эффекты малата и оксалоацетата сонаправлены, что проявляется в торможении активности лактатдегидрогеназы. При внесении оксалоацетата и малата в миллимолярной конечной концентрации (0,1 мМ, 1 мМ, 1,5 мМ, 2 мМ) с высокой статистической значимостью ($p < 0,0001$) происходило ингибирование фермент-субстратного взаимодействия в прямой и обратной реакциях, причем нарастание ингибирующего эффекта имеет дозозависимое влияние лиганда. В конечной концентрации 5 мМ, изучаемые

интермедиаты полностью ингибируют лактатдегидрогеназную систему и активность фермента 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 5.4).

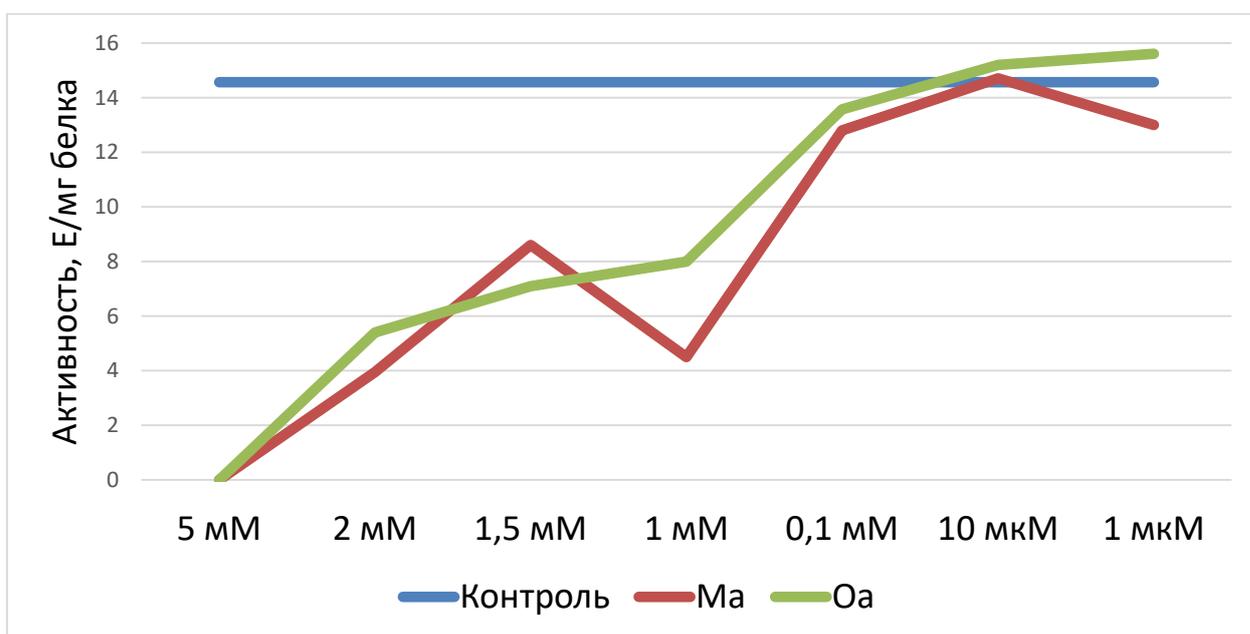


Рисунок 5.4 – Влияние оксалоацетата и малата на активность лактатдегидрогеназы

Известен каталитический механизм лактатдегидрогеназы, который сохраняется среди изоформ и внутри видов. Сначала НАДН, а затем пируват связываются с расщелиной активного центра, вызывая замыкание петли, чтобы изолировать каталитический сайт от свободного растворителя. Arg105 в петле активного сайта блокирует связанный пируват. Гидрид-ион затем переносится из никотинамидного кольца НАДН в карбонильный атом О пирувата, причем гистидин действует как каталитическая общая кислота [S. Kolappan et al. 2015].

Наши эксперименты нашли соответствие с литературными данными, показывающими, что оксалоацетат может обладать ингибирующим действием на лактатдегидрогеназу, однако диапазон концентраций был высокий – 7,5 мМ. Неконкурентное ингибирование фермента не зависит от структурного сходства между субстратом и ингибитором, так как ингибитор связывается с другим сайтом в ферменте, однако многие аллостерические ингибиторы напоминают структуру субстрата. Имеются сведения о том, что оксалоацетат связывает лактатдегидрогеназу аналогично структурно подобному пирувату, образуя тетрамер, а полный тетрамер занимает асимметричную единицу для обоих кристаллов [M.T. Alam et al., 2017].

Является известным, что лактатдегидрогеназа аллостерически ингибируется его субстратом пируватом [C.S. Wang, 1977]. Кроме того, сообщается, что оксалоацетат и малонат также ингибируют лактатдегидрогеназу [A. Steinbuchel, H.G. Schlegel, 1983]. Были произведены расчеты схожести метаболитов и обнаружено, что пируват, малонат и оксалоацетат структурно очень похожи (сходство малонат - пируват - 0,667; оксалоацетат - пируват - 0,685) [M.T. Alam et al., 2017]. Таким образом, оксалоацетат аллостерически ингибирует фермент, и это взаимодействие объясняется структурным сходством с пируватом. Маловероятно, что оксалоацетат играет важную роль в регуляции активности лактатдегидрогеназы *in vivo*, т.к. содержание оксалоацетата в митохондриях клетки незначительное около 2-6 мкмоль/л, в то время как лактатдегидрогеназа локализуется в цитозоле [E.A. Siess et al., 1984].

На наш взгляд имеет большое значение микромолярное влияние изучаемых естественных интермедиатов, что соответствует физиологическим значениям. Стимулирующее действие на функционирование фермент-субстратных систем, термостабилизирующее влияние на конформационную структуру белка при высоких температурах и физиологических условиях, все это отражается на межмолекулярных процессах в условиях влияния

микромолекулярного окружения биологических соединений эндогенного происхождения.

5.3. Влияние биологически активных соединений на функционирование системы малатдегидрогеназа - лактатдегидрогеназа

Следующим этапом было изучение влияния биологически активных соединений на функционирование малатдегидрогеназной и лактатдегидрогеназной каталитических систем. В литературе имеются сведения, что лактатдегидрогеназа и малатдегидрогеназа схожи как по структуре белка, так и по каталитическому механизму, и они катализируют окисление-восстановление общих 2-кетокислот и 2-гидроксикислоты с НАД в качестве кофермента [А. Kazuhito et al., 2001]. В эксперименте мы использовали микромолярные концентрации для изучения функционирования фермент-субстратных систем двух белков. Данные взаимодействия малых молекул пирувата и лактата с малатдегидрогеназой и лактатдегидрогеназой представлены в таблице 5.3.

Обращает на себя внимание, что пируват и лактат в конечной концентрации 10 мкМ обладают со статистической значимостью действием на изучаемую систему ферментов – малатдегидрогеназа и лактатдегидрогеназа. Так, с высокой степенью достоверности в сочетанной фермент-субстратной системе активирующее действие пирувата смещено в сторону лактатдегидрогеназы ($p=0,0001$). Лактат в свою очередь разнонаправленно действует на ферменты, ингибирует малатдегидрогеназу ($p=0,047$) и увеличивает активность лактатдегидрогеназы ($p=0,0006$). При межгрупповом сравнении пары метаболитов достоверно значимым является активирующее действие на системы ферментов пирувата.

Таблица 5.3 – Влияние малых молекул на активность системы ферментов малатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы

		Активность малатдегидрогеназы		Активность лактатдегидрогеназы (прямая реакция)	
		M±m		M±m	
n= 10		Е/л	Е/мг белка	Е/л	Е/мг белка
Контроль		355,8 ± 0,62	1,24 ± 0,002	344,67 ± 5	1,21 ± 0,02
95% ДИ		347,94- 363,66	1,22 - 1,27	322,96 - 366,37	1,13 - 1,28
0,01 мкМ	Пируват	348,4 ± 1,5	1,22 ± 0,005	328 ± 5	1,15 ± 0,02
	95% ДИ	341,89- 354,92	1,19 - 1,24	264,47- 391,53	0,93 - 1,37
	Достоверность	0,034		0,112	
	р МДГ-ЛДГ	0,016			
	Лактат	350,7 ± 2,4	1,23 ± 0,008	324,3 ± 6,7	1,13 ± 0,02
	95% ДИ	340,41- 361,08	1,19 - 1,26	295,54- 353,13	1,03 - 1,24
	Достоверность	0,205		0,072	
	р МДГ-ЛДГ	0,02			
	р П-Л	0,456		0,722	
0,1 мкМ	Пируват	359 ± 0,05	1,255±0,0002	341,3 ± 2,3	1,2 ± 0,008
	95% ДИ	358,35- 359,66	1,25 - 1,257	331,29- 351,37	1,16 - 1,23
	Достоверность	0,035		0,581	
	р МДГ-ЛДГ	0,009			
	Лактат	359,2 ± 2,0	1,26 ± 0,007	328 ± 3,5	1,15 ± 0,01
	95% ДИ	333,19- 385,12	1,17 - 1,35	312,89- 343,11	1,09 - 1,20
	Достоверность	0,257		0,053	
	р МДГ-ЛДГ	0,007			
	р П-Л	0,950		0,034	
1 мкМ	Пируват	362,1 ± 1,8	1,27 ± 0,006	347 ± 4	1,2 ± 0,014
	95% ДИ	357,19- 367,09	1,25 - 1,28	332,79- 357,21	1,16 - 1,22
	Достоверность	0,088		0,454	
	р МДГ-ЛДГ	0,018			
	Лактат	357,84 ± 1,2	1,25 ± 0,004	337,67 ± 4	1,18 ± 0,01
	95% ДИ	354,39+361,29	1,24 + 1,26	327,43 - 347,90	1,15 - 1,22

	Достоверность	0,377		0,330	
	p МДГ-ЛДГ	0,001			
	p П-Л	0,083		0,094	
10 мкМ	Пируват	387,5 ± 1,0	1,36 ± 0,003	416,3 ± 0,67	1,46 ± 0,002
	95% ДИ	374,80+ 400,12	1,31 - 1,39	413,47 - 419,20	1,45 - 1,47
	Достоверность	0,001		0,0001	
	p МДГ-ЛДГ	0,0001			
	Лактат	344,2 ± 2,54	1,2 ± 0,009	354,3 ± 6,4	1,24 ± 0,02
	95% ДИ	311,98+ 376,40	1,09 - 1,32	326,97 - 381,70	1,14 - 1,34
	Достоверность	0,047		0,299	
	p МДГ-ЛДГ	0,3150			
	p П-Л	0,0039		0,0006	

Конечная концентрации биологически активных соединений 1 мкМ и 0,1 мкМ обладают разнонаправленными действиями на активность каталитических систем. Отмечается активирующее действие указанных концентраций лигандов на малатдегидрогеназную и ингибирующее влияние на лактатдегидрогеназную системы. При межгрупповом сравнении каталитических систем интересным является, что лактат в концентрациях 1 мкМ ($p=0,0016$) и 0,1 мкМ ($p=0,0074$) смещает фермент-субстратное равновесие в сторону лактатдегидрогеназной системы, а пируват в в этих же концентрациях (1 мкМ ($p=0,0181$) и 0,1 мкМ ($p=0,0099$)) усиливает активность малатдегидрогеназы.

Исучаемые интермедиаты в наименьшей концентрации 0,01 мкМ обладают ингибирующим влиянием как на лактатдегидрогеназную, так и на малатдегидрогеназную системы. При межгрупповом сравнении каталитических систем, достоверным является смещение фермент-субстратного взаимодействия под влиянием пирувата в сторону малатдегидрогеназной системы ($p=0,0167$). А влияние лактата смещает каталитическую систему в сторону ингибирования лактатдегидрогеназы ($p=0,0206$). Вероятно, инкубация с пируватом в концентрация 0,01 мкМ

изменяет конформационную структуру малатдегидрогеназы, разворачивая молекулу и открывая активные участки для связывания, лактат же в свою очередь активнее влияет на лактатдегидрогеназу, изменяя конфигурацию молекулы.

Таким образом, проведенный эксперимент в сочетанной системе ферментов со сходной структурой белковых молекул показал разнонаправленное действие окислительно-восстановительной пары пируват-лактат в микромолярных концентрациях на малатдегидрогеназу и лактатдегидрогеназу. Естественный метаболит лактат в диапазоне концентраций 1 мкМ, 0,1 мкМ, 0,01 мкМ обладает ингибирующим действием на лактатдегидрогеназу, пируват в этих же концентрациях изменяет активность малатдегидрогеназы в системе ферментов. Смещение действия пирувата в сторону малатдегидрогеназной системы, вероятно можно объяснить структурным сходством биологически активных соединений оксалоацетата и пирувата (составляет - 0,685) [M.T. Alam et al., 2017]. Изменение конформационной структуры белковой молекулы малатдегидрогеназы при действии пирувата в микромолярных концентрациях обуславливает открытие активных центров связывания для лиганда и доступность прохождения фермент-субстратного взаимодействия.

Отмечается дозозависимое влияние пирувата на функционирование системы ферментов малатдегидрогеназа – лактатдегидрогеназа (рисунок 5.5).

Диапазон концентраций пирувата 0,1 мкМ – 10 мкМ обладает активирующим действием на образование фермент-субстратного комплекса малатдегидрогеназы. Увеличение активности малатдегидрогеназы при взаимодействии с лигандом в концентрации 10 мкМ составляет 10% ($p=0,0014$). Лишь наименьшая концентрация пирувата 0,01 мкМ достоверно снижает активность фермента ($p=0,0347$). В отношении второго фермента системы – лактатдегидрогеназы, также отмечается дозозависимое влияние, но несколько отличающееся. Малых концентраций пирувата (0,01 мкМ – 1

мкМ) не достаточно для полноценного функционирования фермент-субстратного комплекса, происходит конкуренция за истинный субстрат с малатдегидрогеназой, что приводит к снижению активности лактатдегидрогеназы, и вероятно изменению конформационной структуры белковой молекулы. Лишь пирувата в концентрации 10 мкМ достаточно для покрытия субстратной потребности лактатдегидрогеназы и функционирования двух ферментативных систем, что выражается в активирующем действии как малатдегидрогеназы, так и истинного фермента для изучаемых субстратов лактатдегидрогеназы.

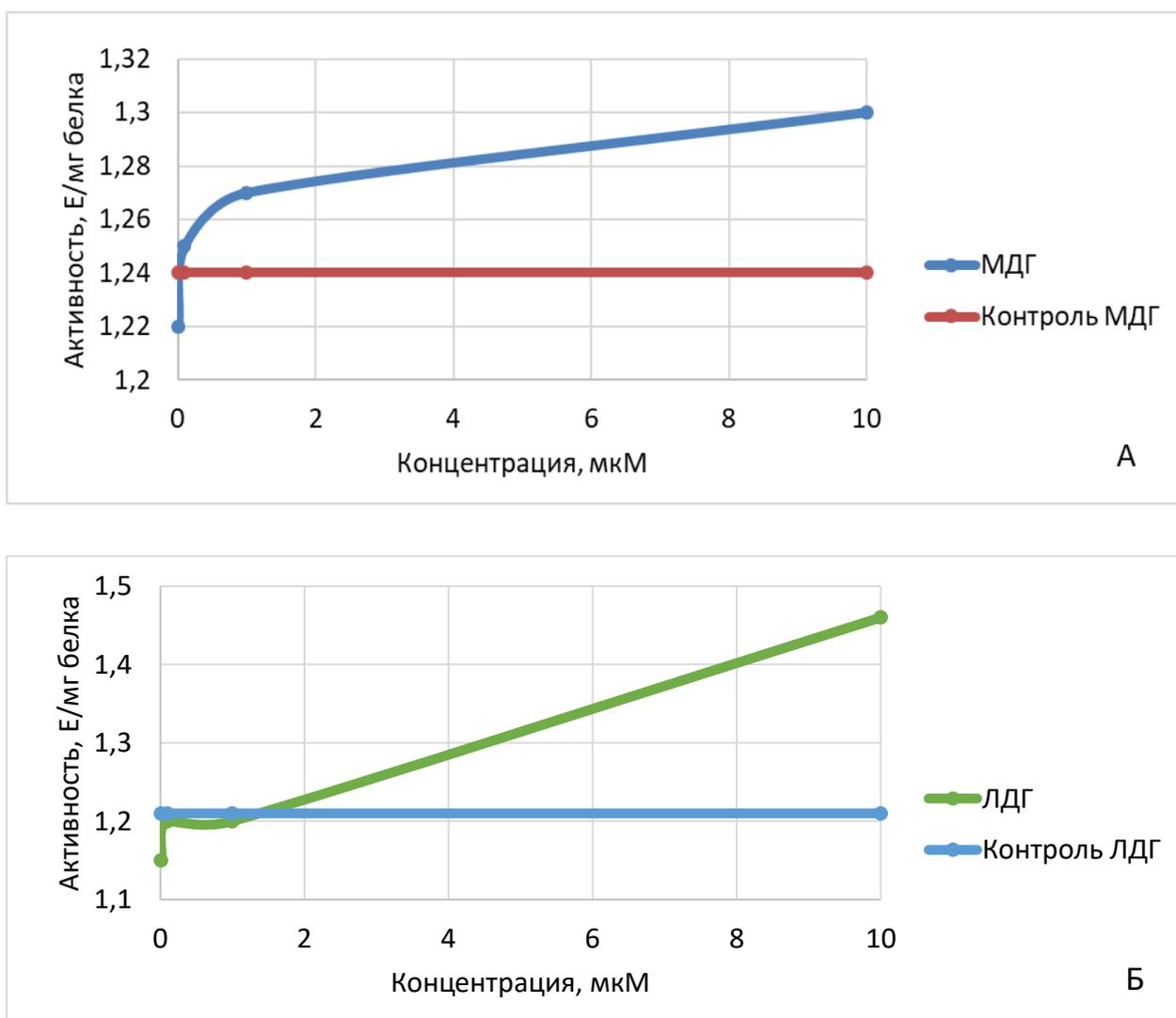


Рисунок 5.5 – Влияние пирувата на каталитические системы ферментов малатдегидрогеназы (А) и лактатдегидрогеназы (Б)

Согласно литературным данным, лактатдегидрогеназа и малатдегидрогеназа проявляют заметную активность в отношении двух субстратов как оксалоацетата, так и пирувата [А. Kazuhito et al., 2001]. Механизм катализа малатдегидрогеназы аналогичен механизму лактатдегидрогеназы, фермента, с которым она имеет сходную трехмерную структуру: прямая реакция ограничена скоростью разложения соединения фермент-НАДН. В малатдегидрогеназе эта скорость несколько (в 3 раза) больше зависит от состояния протонирования незаменимого гистидина, чем в лактатдегидрогеназе. В обратных реакциях стадия ограничения скорости представляет собой перегруппировку фермента НАДН-кетосодержащего соединения [А. Lodola et al., 1978]. В обоих ферментах перенос гидрида с природными субстратами неизмеримо быстр. Малат- и лактатдегидрогеназы содержат необходимый гистидин, и ионизация этого остатка ответственна за взаимодействия, которые могут активировать окисленный кофермент. Оба фермента превращают субстраты в процессе обязательного упорядочения: в лактатдегидрогеназе этот порядок связывания связан с удлинённой петлей полипептидной цепи, которая может захватывать связанные восстановленные молекулы кофермента, и малатдегидрогеназа также содержит эту петлю полипептидной цепи, что свидетельствует о гомологичных механизмах. механизмы

Было показано, что при перестройке молекул малатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы субстратная специфичность фермента может быть изменена путем замены одной аминокислоты. Аминокислота в положении 102 представляет собой аргинин в малатдегидрогеназе и глутамин в лактатдегидрогеназе. Переключение специфичности, наблюдаемое в лактатдегидрогеназе *B. sphaerothermophilus* и малатдегидрогеназе *H. marismortui*, может отражать тесную филогенетическую связь этих ферментов. Аргининовый остаток малатдегидрогеназы, по-видимому, обеспечивает механизм, который предотвращает катализ пирувата, что имеет физиологическое значение для организма из-за относительно высоких

концентраций пирувата *in vivo* [C.R. Goward, D.J. Nicholls, 1994].

Далее мы сравнили влияние биологически активных лигандов на фермент-субстратное взаимодействие изучаемых каталитических белков и системы ферментов (рисунок 5.6). Интересными являются данные, что дегидрогеназы *Homo sapiens* (глицерофосфатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, алкогольдегидрогеназа, изоцитратдегидрогеназа и другие) имеют структурное сходство между собой [L.S. Mudy et al., 2019]. Последовательности этих ферментов примерно на 20% имеют идентичные последовательности и содержат соответствующую складку Россмана для связывания кофактора. Кроме того, большинство из них обнаруживаются в открытых и закрытых конформациях, являются димерами, и можно обнаружить роль общего основания – лизина - в активном сайте [S. Kolappan et al. 2015, M. Gonzalez et al., 2018]. Архитектура активного сайта и, следовательно, специфичность субстрата может варьироваться от одной дегидрогеназы к другой, так как они имеют похожую структуру.

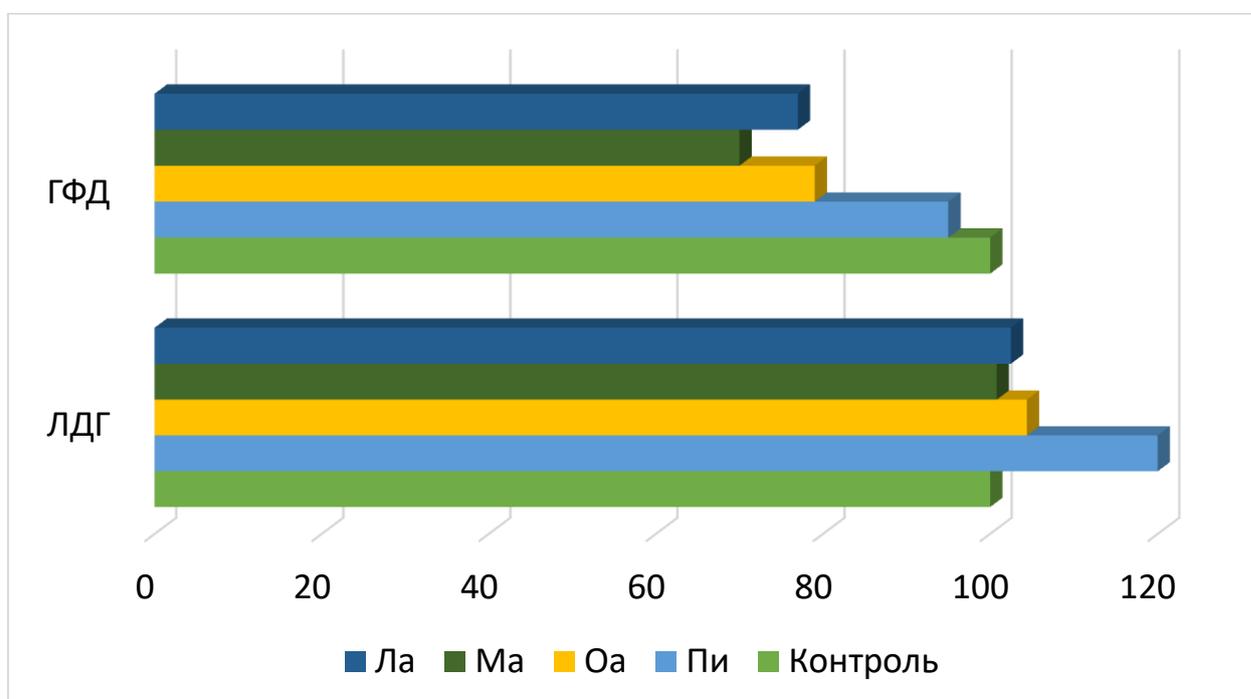


Рисунок 5.6 – Влияние биологически активных соединений (10 мкМ концентрации) на глицерофосфатдегидрогеназу и лактатдегидрогеназу

Анализ полученных данных серии экспериментов с дегидрогеназами показал разнонаправленное действие изучаемых естественных интермедиатов (пируват, оксалоацетат, лактат и малат) в конечной концентрации 10 мкМ на глицерофосфатдегидрогеназу и лактатдегидрогеназу (рис. 5.6). Обращает на себя внимание активирующее действие изучаемых лигандов на прямую реакцию (пируват – лактат) лактатдегидрогеназной системы и ингибирующее влияние на глицерофосфатдегидрогеназную систему. Стоит отметить, что сходные по строению кетокислоты пируват и оксалоацетат обладают большим действием на активность лактатдегидрогеназы, что вероятно, связано с конформационной структурой белковой молекулы и доступностью активного центра для связывания с низкомолекулярными лигандами. В свою очередь, гидроксикислоты малат и лактат, возможно, нарушают электростатические взаимодействия аминокислотных боковых цепей в активном сайте фермента, что приводит к снижению каталитической активности глицерофосфатдегидрогеназной системы.

Молекула лактатдегидрогеназы, связанная с НАДН имеет довольно широкий спектр конформаций белка, некоторые из которых дают довольно легкий доступ лиганда к активному сайту [J.R. Echequiel et al., 2007]. Подвижная петля фермента, возможно, только частично открыта в этих конформациях, что в результате приводит к множественным взаимодействиям. Открытая конформация белка не требует крупномасштабного развертывания или плавления бинарного комплекса. Открытые и закрытые состояния молекулы обусловлены тонкими перегруппировками белка и воды, а также изменениями в сольватации и внутренней перегруппировке водородных связей. Мы предполагаем, что такой вид взаимодействия может быть необходим для эффективного попадания лиганда в связывающий карман, который расположен довольно глубоко внутри белка.

Таким образом, для того, чтобы ферменты распознавали свои уникальные субстраты должен существовать набор определяющих специфичность факторов, в частности, остатки аминокислот, структурные, динамические и физико-химические свойства, прямо или косвенно влияющие на взаимодействие и трансформацию. Связывание субстрата в каталитических центрах ферментов является одним из наиболее важных механизмов специфичности субстрата. В каталитических центрах геометрическое расположение и физико-химические свойства неводородных атомов и их соответствующих остатков часто наиболее определяющая сила в управлении динамикой взаимодействия фермента с субстратом. Петлевые движения белковой молекулы под влиянием биологически активных соединений могут вызывать конформационные изменения в участках связывания субстрата и, следовательно, влиять на специфичность связывания фермента с субстратом. Наконец, связывание кофактора и меж- или внутримолекулярное взаимодействие могут избирательно активировать фермент по отношению к его субстратам.

Полученные нами результаты свидетельствуют о влиянии биологически активных соединений (пирувата, лактата, оксалоацетата и малата) на фермент-субстратное взаимодействие каталитических белков – глицерофосфатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы. Выявлено дозозависимое влияние оксалоацетата и малата на работу лактатдегидрогеназы, пирувата на функционирование малатдегидрогеназы, что также отражается на функциональном проявлении. Стабилизирующее воздействие на структуру белковой молекулы и активирующее на ее функцию оказывают микромолярные концентрации оксалоацетата и малата, а более высокие концентрации биологически активных соединений дестабилизируют конформацию лактатдегидрогеназы и ингибируют его функцию.

Проведенные серии экспериментов показали, что изучаемые естественные интермедиаты влияют на изолированные каталитические белки, а также на функционирование фермент-субстратных систем *in vitro*, что приближает нас к раскрытию их роли в межмолекулярных взаимодействиях. Вместе с тем, возникают новые вопросы, ответы на которые нам поможет дать расширение методологических возможностей постановки экспериментальных работ и использование клеточных технологий. Следующим этапом нашей работы является выяснение регуляторного влияния малых молекул *in vivo* на культуру клеток фибробластов с перспективой клинического применения имеющихся данных.

ГЛАВА VI.

КЛЕТОЧНАЯ КУЛЬТУРА ФИБРОБЛАСТОВ И МАЛЫЕ МОЛЕКУЛЫ

Воздействие интермедиатов метаболических путей на протекание биологических процессов и их роль в изменении жизнеспособности клеток представляет собой актуальную область исследований: появляются данные, раскрывающие функциональный потенциал низкомолекулярных биологически активных соединений как регуляторов обменных процессов, сигнальных молекул, вместе с тем этот вопрос остается недостаточно изученным. Мы изучили влияние биологически активных соединений на функционирование изолированных от микроокружения фермент-субстратных систем *in vitro*, но очень мало знаем о том, каким образом метаболиты взаимодействуют *in vivo* в клетке с учетом надмолекулярной субстратной и ферментативной организации. Как известно, культура клеток фибробластов представляет собой мезенхимальные стромальные клетки, синтезирующие коллаген и другие макромолекулы матрикса, выполняющие функцию структурной поддержки соединительных тканей. По мнению ряда авторов и R. Kalluri (2016) фибробласты являются перспективной тест-системой для исследования динамических молекулярных процессов, которые лежат в основе роста и пролиферации клеток, метаболизма и передачи внутри- и внеклеточных сигналов.

Нами была поставлена цель изучить особенности протекания метаболических процессов, функционирования фермент-субстратных систем в дермальных фибробластах человека, а также оценить изменение пролиферативной активности и жизнеспособности клеточной культуры в зависимости от воздействия лактата, пирувата, малата, оксалоацетата.

6.1 Особенности протекания метаболических процессов в культуре фибробластов при инкубации с малыми молекулами

В культуре клеток дермальных фибробластов мы рассматриваем метаболиты как фенотипический ответ биологических систем на происходящие в их микроокружении изменения. Согласно L. Willmann метаболиты культуры клеток состоят из внутриклеточных метаболитов (эндометаболизма) и метаболитов, выделяемых во внеклеточную среду (экзометаболизма) [L. Willmann et al., 2015]. При изучении клеточных культур необходимо учитывать общий метаболический статус используемых клеток *in vitro*, относительную интенсивность различных метаболических процессов, а также изменения, вызванные исследуемыми факторами. Для оценки метаболического профиля эндометаболизма мы использовали лизат клеточной культуры фибробластов, внеклеточная среда оценивалась в надосадочной жидкости, в которой росли клетки. В таблицах 6.1 и 6.3 представлены данные метаболического профиля углеводного, липидного обменов клеточной культуры фибробластов после инкубации с малыми молекулами в конечной концентрации 1,5 мМ.

При анализе полученных данных обращает на себя внимание, что при внесении малых молекул - пирувата, оксалоацетата, малата в инкубационную среду с фибробластами происходит достоверное снижение холестерина в супернатанте фибробластов, что является косвенным показателем активации процессов пролиферации. Максимальное снижение (на 32%) содержания холестерина отмечается при внесении пирувата ($p = 0,003$) в культуральную среду с фибробластами $0,075 \pm 0,0056$ ммоль/л, по сравнению с контрольным значением $0,11 \pm 0,0067$ ммоль/л. Оксалоацетат ($p = 0,033$) и малат ($p = 0,004$) одинаково снижают уровень холестерина на 27% в отличие от контрольных значений супернатанта в котором росли фибробласты. При введении лактата в среду для роста клеток отмечается снижение содержания холестерина на 18% по сравнению с контролем фибробластов.

Таблица 6.1 – Метаболический профиль надосадочной жидкости фибробластов после культивирования с малыми молекулами

	Контроль среда M±m	Контроль с ФБ M±m	Пируват M±m	Малат M±m	Лактат M±m	Оксалоацетат 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	0,09-0,103	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
р ANOVA			р П-Л <0,0001			
	Контроль среда M±m	Контроль с ФБ M±m	Пируват M±m	Малат M±m	Лактат M±m	Оксалоацетат M±m
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
р ANOVA			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	0,003–0,004	0,118-0,119	0,89 -0,92	0,13 -0,22	0,03-0,03	0,61-0,624
р контроль среда		< 0,0001				
р контроль с ФБ			< 0,0001	0,0003	< 0,0001	< 0,0001
р ANOVA			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
р ANOVA			р П-Л 0,0179		р О-Л 0,0208	
			р М-Л 0,0219			

Условные обозначения: M ± m – среднее арифметическое значение и ошибка среднего, 95% ДИ - 95% доверительный интервал, р – уровень межгрупповой значимости. П – пируват, Л – лактат, О – оксалоацетат, М – малат.

При сравнении питательной среды без клеток с клеточной средой наблюдается увеличение на 12% содержания холестерина. При межгрупповом сравнении пар метаболитов окислительно-восстановительных

партнеров пируват – лактат ($p < 0,0001$) отмечается достоверно значимое действие пирувата, выражающееся в снижении уровня холестерина. Выделение холестерина фибробластами показывает, что его синтез из ацетил-КоА превышает внутриклеточные требования. Холестерин, возможно, вырабатывается фибробластами в соответствии с генетически детерминированной программой клеточного метаболизма *in vivo*.

Данные по содержанию глюкозы в культуральной жидкости (контрольной с фибробластами и с биологически активными соединениями) показывают снижение уровня глюкозы по сравнению с контрольными показателями. Так, содержание глюкозы в контрольной среде без клеток составляет $6,0 \pm 0,09$ ммоль/л. Уровень глюкозы в супернатанте в котором росли фибробласты, без добавления изучаемых интермедиатов достоверно изменился на 28% и составил $4,3 \pm 0,1$ ммоль/л ($p < 0,0001$). Фибробласты, которые инкубировались с биологически активными соединениями еще больше утилизируют глюкозу из культуральной жидкости. Так, при добавлении пирувата ($p < 0,0001$) снижалась концентрация глюкозы на 21%, малата ($p = 0,0017$) – на 15%, некоторое снижение оксалоацетата по сравнению с контролем. Добавление лактата ($p < 0,0001$) в среду для роста фибробластов повышает уровень глюкозы на 25% по сравнению с супернатантом с фибробластами, уровень остается ниже по сравнению со средой без клеток. При межгрупповом сравнении пар метаболитов гидроксикислот малат – лактат ($p < 0,0001$), и окислительно-восстановительных партнеров пируват – лактат ($p = 0,0046$) отмечается достоверно значимое усвоение глюкозы фибробластами, которые росли в среде с этими биологически активными соединениями. Причем потребление глюкозы фибробластами, растущими в среде с малатом и пируватом выше. Полученное разнонаправленное действие связано с избирательной утилизацией метаболитов: уменьшение уровня глюкозы после культивирования с пируватом, вероятно свидетельствует о пластической

роли - донор углеродного скелета при построении аминокислот, а повышение глюкозы при росте с лактатом, возможно, связано с конверсией в глюкозу *de novo* в глюконеогенезе.

При изучении метаболизма лактата отмечается его накопление в надосадочных жидкостях где росли фибробласты. Исходное значение лактата в контрольной среде без клеток составляет $2,58 \pm 0,1$ ммоль/л. Фибробласты преобразуют большую часть глюкозы питательной среды в лактат, при этом его значение в надосадочной жидкости увеличилось более чем в 2,5 раза и составило $6,8 \pm 0,4$ ммоль/л. Добавление пирувата, малата и оксалоацетата в среду с растущими фибробластами способствует меньшему накоплению лактата в супернатанте по сравнению с клеточным контролем, однако эти значения выше, чем в исходном контроле (питательной среде без клеток) ($p < 0,0001$). При межгрупповом сравнении пар метаболитов гидроксикислот малат – лактат ($p = 0,02$), и окислительно-восстановительных партнеров пируват-лактат ($p = 0,017$) которые добавлялись к фибробластам, отмечается достоверно значимое выделение клетками молочной кислоты в среду. При добавлении пирувата отмечается наименьшее в группе выделение молочной кислоты в среду. Инкубация клеток с лактатом увеличивает содержание этого метаболита в среде для роста примерно в 10 раз. В литературе имеются сведения, что при культивировании клеток концентрация молочной кислоты может увеличиваться до 10-18 раз в сравнении с контрольной средой. Выделение сравнительно большого количества лактата свидетельствует о высокой активности процессов анаэробного гликолиза при выращивании фибробластов, при этом активность процессов цикла Кребса в дермальных фибробластах *in vitro* ниже [W. Zwerschke et al., 2003]. Введение в питательную среду 1,5 мМ раствора лактата замедляет употребление фибробластами глюкозы на 25%.

При анализе уровня пирувата, обращает на себя внимание увеличение этого показателя в 30 раз в среде с фибробластами ($p < 0,0001$) по сравнению

с контрольной питательной средой без клеток - $0,0039 \pm 0,00013$ ммоль/л, что свидетельствует о выделении этого метаболита во внеклеточную жидкость. Культивирование клеток в среде с добавлением раствора пирувата ($p < 0,0001$) достоверно увеличивает уровень этого метаболита в супернатанте в 7,6 раз, при росте клеток с раствором оксалоацетата ($p < 0,0001$) наблюдается также увеличение содержания пирувата в 5,2 раза по сравнению с контрольными значениями среды с фибробластами. Это объясняется структурным сходством этих двух биологически активных соединений, оксалоацетат отличается от пирувата наличием дополнительной карбоксильной группы. Добавление лактата в среду для роста фибробластов снижает уровень пирувата в супернатанте на 74% ($p < 0,0001$). Сравнение окислительно-восстановительных партнеров пирувата и лактата ($p = 0,01$), которые добавляли к фибробластам, показывает достоверно значимое разнонаправленное действие этих биологически активных соединений в группе в отношении содержания пирувата в супернатанте. При межгрупповом сравнении пар метаболитов пируват – малат ($p = 0,0029$), отмечается достоверно значимое увеличение пирувата в надосадочной жидкости фибробластов.

Эффекты субстратов углеводного обмена (рисунок 6.1) - глюкозы, лактата и пирувата - заключаются в обеспечении энергии клеток за счет окисления в цикле трикарбоновых кислот. 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*.

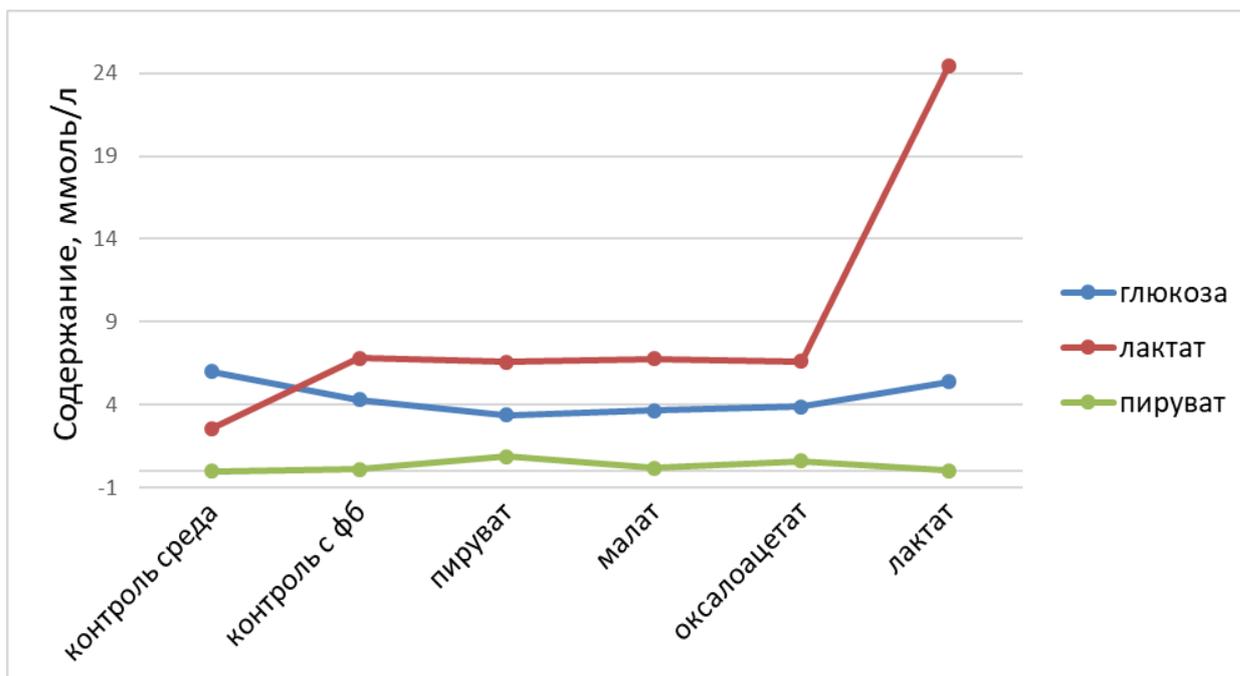


Рисунок 6.1 – Содержание метаболитов углеводного обмена во внеклеточной жидкости фибробластов

Клеточный углеводный метаболизм фибробластов оценивали путем измерения потребления глюкозы и продукции лактата соответственно, а также путем определения коэффициентов глюкоза/лактат и глюкоза/пируват в надосадочной и внутриклеточной среде фибробластов (таблица 6.2 и 6.4).

Анализ полученных коэффициентов глюкоза/лактат показал следующие особенности: наиболее высокий индекс характерен в экспериментах с малатом $0,6 \pm 0,007$, а самый низкий – для лактата $0,2 \pm 0,0052$ ($p=0,0014$). При межгрупповом сравнении обращает на себя внимание достоверное отличие полученного соотношения в парах между всеми метаболитами, что указывает на индивидуальные особенности утилизации энергетических субстратов при культивировании фибробластов с различными малыми молекулами.

Таблица 6.2 – Индексы углеводного обмена в супернатанте фибробластов после культивирования с малыми молекулами

	Контроль среда M±m	Контроль с ФБ M±m	Пируват M±m	Малат M±m	Лактат M±m	Оксалоацетат M±m
Глюкоза/лактат	2,38 ± 0,045	0,57 ± 0,063	0,49 ± 0,0073	0,6 ± 0,007	0,2 ± 0,0052	0,55 ± 0,0054
95% ДИ	2,24 - 2,52	0,37 - 0,77	0,46 - 0,52	0,57 - 0,63	0,197 - 0,23	0,52 - 0,57
Достоверность		< 0,0001				
Достоверность			0,3333	0,6985	0,0014	0,7652
Межгрупповые сравнения ANOVA			p П-Л 0,0063 p П-М 0,0414 p О-Л 0,0001 p М-Л 0,0059			
Глюкоза/пируват	1480,1±34,2	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
Достоверность		< 0,0001				
Достоверность			< 0,0001	0,0024	< 0,0001	< 0,0001
Межгрупповые сравнения ANOVA			p П-М 0,05			

Условные обозначения: M ± m – среднее арифметическое значение и ошибка среднего, 95% ДИ - 95% доверительный интервал, p – уровень межгрупповой значимости. П – пируват, Л – лактат, О – оксалоацетат, М – малат.

Изучение коэффициента глюкоза/пируват выявило его достоверно значимое снижение в сравнении с контролем для всех изучаемых биологически активных соединений, кроме в экспериментах с пируватом, однако, при межгрупповом сравнении полученного эффекта между парами метаболитов не было выявлено достоверных отличий за исключением пары малат-пируват (p=0,05).

Далее мы проанализировали содержание внутриклеточных метаболитов фибробластов (таблица 6.3).

При анализе показателей эндометаболизма отмечается, что культивирование фибробластов с растворами биологически активных

соединений способствует понижению внутриклеточного содержания глюкозы, по сравнению с контрольными значениями $0,02 \pm 0,0045$ ммоль/л. Наибольшее снижение на 60% уровня глюкозы внутри клетки отмечается при росте клеток с раствором лактата ($p=0,04$). Добавление в питательную среду растворов пирувата, малата и оксалоацетата также приводит к снижению этого показателя в клеточном лизате. Культивируемым фибробластам присущи преобладание гликолитических процессов.

Таблица 6.3 – Внутриклеточные метаболиты фибробластов после инкубации с малыми молекулами

	Контроль ФБ M±m	Пируват M±m	Малат M±m	Лактат M±m	Оксалоацетат M±m
Глюкоза, ммоль/л	$0,02 \pm 0,0045$	$0,014 \pm 0,0025$	$0,016 \pm 0,0025$	$0,008 \pm 0,002$	$0,012 \pm 0,002$
95% ДИ	0,0075 - 0,032	0,0072 - 0,02	0,0092 - 0,023	0,0025 - 0,014	0,0065 - 0,018
Достоверность		0,27	0,45	0,04	0,14
Пируват, ммоль/л	$0,0041 \pm 0,00006$	$0,032 \pm 1$	$0,00016 \pm 0,00004$	$0,0026 \pm 0,000058$	$0,0051 \pm 0,000058$
95% ДИ	0,0039 – 0,004	0,028– 0,036	0,00005- 0,0002	0,0024 – 0,002	0,0049 – 0,005
Достоверность		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Межгрупповые сравнения ANOVA		p П-М 0,0051 p П-Л 0,0060 p П-О 0,0071	p М-Л < 0,0001 p М-О < 0,0001 p Л-О < 0,0001		
Лактат, ммоль/л	$0,026 \pm 0,0025$	$0,022 \pm 0,002$	$0,016 \pm 0,004$	$0,05 \pm 0,013$	$0,016 \pm 0,004$
95% ДИ	0,019 - 0,033		0,0049 - 0,027	0,013 - 0,087	0,0049 - 0,027
Достоверность		0,2415	0,0656	0,1165	0,0656

Условные обозначения: $M \pm m$ – среднее арифметическое значение и ошибка среднего, 95% ДИ - 95% доверительный интервал, p – уровень межгрупповой значимости. П – пируват, Л – лактат, О – оксалоацетат, М – малат.

При оценке уровня пирувата, обращает на себя внимание разнонаправленное влияние изучаемых интермедиатов на его

внутриклеточное содержание. Культивирование клеток в среде с добавлением раствора пирувата ($p < 0,0001$) достоверно 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% по сравнению с контрольными значениями, 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 ($p = 0,0071$), в которых росли фибробласты, показывает достоверно значимое увеличение внутриклеточного содержания пирувата. При межгрупповом сравнении гидроксикислот малат-лактат ($p < 0,0001$), отмечается достоверно значимое снижение этого показателя в питательной жидкости с добавлением малата.

При анализе показателей лактата внутри клетки отмечается снижение уровня этого метаболита в лизате клеток, растущих в питательных средах с добавлением пирувата на 15%, а малата и оксалоацетата на 38,5%. Культивирование фибробластов с лактатом приводит к избыточному производству лактата внутри клетки в 2 раза по сравнению с лизатом контрольных фибробластов, что является артефактом.

Анализ полученных 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. При межгрупповом сравнении отсутствуют достоверные отличия в парах между всеми метаболитами. Изучение коэффициента глюкоза/пируват выявило его достоверно значимое снижение в сравнении с контролем для всех изучаемых биологически активных соединений, при межгрупповом сравнении

полученного эффекта были выявлены достоверные отличия для всех пар изучаемых метаболитов.

Таблица 6.4 – Индексы глюкоза/лактат, глюкоза/пируват в лизате фибробластов после культивирования с малыми молекулами

	Контроль с ФБ M±m	Пируват M±m	Малат M±m	Лактат M±m	Оксалоацетат M±m
Глюкоза/лактат	0,8 ± 0,21	0,67 ± 0,14	0,8 ± 0,12	0,29 ± 0,087	0,6 ± 0,1
95% ДИ	0,23 - 1,37	0,28 - 1,05	0,46 - 1,14	0,049 – 0,53	0,32 - 0,88
Достоверность		0,6075	1,0000	0,05	0,4094
Межгрупповые сравнения ANOVA		Отсутствуют			
Глюкоза/пируват	4,88 ± 1,4	0,42 ± 0,12	0,8 ± 0,12	3,85 ± 0,086	1,96 ± 0,02
95% ДИ	0,39 - 9,37	0,09 – 0,93	0,46 – 0,14	3,58 – 4,12	1,89 - 2,0
Достоверность		0,0445	0,0136	0,4941	0,0840
Межгрупповые сравнения ANOVA		p П-Л 0,002		p М-Л 0,0474	
		p П-О 0,0224			
		p О-Л 0,0093			

Условные обозначения: M ± m – среднее арифметическое значение и ошибка среднего, 95% ДИ - 95% доверительный интервал, p – уровень межгрупповой значимости. П – пируват, Л – лактат, О – оксалоацетат, М – малат.

Согласно литературным данным, энергетические потребности фибробластов удовлетворяются за счет использования анаэробного гликолиза и в меньшей степени за счет использования окисления глутамина. Клетки в культуре проходят через две фазы. В начальную фазу роста за счет использования гликолиза вырабатывается лактат с коэффициентом 1,6 нмоль

на моль глюкозы. Замена культуральной среды и удаление накопленного лактата, восполняет глюкозу, что приводит к более быстрому её усвоению. Утилизация лактата при исчерпании глюкозы, происходит только потому, что нет доступных гексозных субстратов [N. Maskau et al., 2007]. Рост в неизменной среде свидетельствует о быстрой гликолитической фазе при пролиферации клеток и окислительной фазе при сплошном росте. Так, при добавлении 10 мМ лактата может быть снижена достаточно заметно утилизация глюкозы, что также подтверждается нашим экспериментом. Введение в питательную среду 1,5 мМ раствора лактата замедляет употребление фибробластами глюкозы на 25%. Эффект этих трех углеродных субстратов заключается в обеспечении энергии за счет окисления в цикле трикарбоновых кислот.

Способность клеток использовать глюкозу снижается по мере того, как они переходят в фазу сплошного роста. Снижение утилизации глюкозы, наблюдаемое в растущих культурах при достижении сплошного роста, вероятно, связано со снижением роста клеток и оборота АТФ, что создает меньшую потребность на синтез АТФ при помощи гликолиза, и с увеличением концентрации лактата, что приводит к более заметной роли окислительного метаболизма в синтезе АТФ, тем самым замедляя анаэробное превращение глюкозы. [N. Maskau et al., 2007] Таким образом, культура фибробластов является экспериментальной моделью для оценки метаболического профиля и вариабельности экзо- и эндометаболизма, связанной с изменением инкубационной среды во время исследования. Далее мы проанализировали активность ферментов фибробластов при культивировании в питательных средах с добавлением биологически активных соединений.

6.2 Изучение влияния малых молекул на функционирование ферментативных систем фибробластов

Регуляция метаболизма в фибробластах осуществляется совокупностью ферментов, которая определяется их микроокружением и функционирует как сложное надмолекулярное образование, способное функционировать в виде комплексов с белками цитоскелета, другими ферментами, мембранами органелл клетки [Е.И. Ерлыкина, 2006]. Нами была произведена серия экспериментов по культивированию фибробластов в питательных средах с преинкубацией с пируватом, лактатом, малатом с последующим анализом активности ферментов в надосадочной жидкости фибробластов и лизате клеток (таблица 6.5, 6.6).

При анализе полученных данных обращает на себя внимание, что по сравнению с питательной средой без клеток добавление культуры фибробластов приводит к значимому увеличению активности глицерофосфатдегидрогеназы ($p=0,047$) и щелочной фосфатазы ($p=0,0002$), активность гамма-глутамилтранспептидазы имеет обратную тенденцию - снижается.

Изучение активности глицерофосфатдегидрогеназы необходимо для понимания происходящих в клетке метаболических процессов между энергетическим и липидным обменами. Культивирование фибробластов с пируватом ($p=0,0003$) приводит к выраженному увеличению активности глицерофосфатдегидрогеназы в надосадочной жидкости по сравнению с клеточным контролем $0,064 \pm 0,015$ Е/л, вследствие чего, по-видимому, происходит возрастание эффективности энергетического обмена. Добавление лактата ($p=0,027$) в питательную среду, в свою очередь приводит к значимому ингибирующему действию на глицерофосфатдегидрогеназу, при этом, вероятно, оттока субстратов из липидного пула в энергетический обмен практически не происходит, что связано с пластической

необходимостью делящихся клеток. При этом эффект в паре пируват-лактат статистически различим ($p=0,0192$).

Таблица 6.5 – Активность ферментов фибробластов в надосадочной жидкости после культивирования с малыми молекулами

	Контроль среда M±m	Контроль с ФБ M±m	Пируват M±m	Малат M±m	Лактат M±m
ГФД, Е/мл	0,022±0,0009	0,064±0,01	1,4 ± 0,11	0,057±0,019	0,013±0,001
95% ДИ	0,018 - 0,025	0,0006-0,13	0,9 - 1,8	0,025 – 0,14	0,0065-0,019
Достоверность Контроль среда		0,0479			
Достоверность Контроль с ФБ			0,0003	0,7867	0,0276
Межгрупповые сравнения ANOVA			p П-Л 0,0192 p П-М 0,0276		
ЩФ, Е/л	24,15 ± 0,22	33,95 ± 1,19	26,97 ± 1,13	28,97 ± 0,88	34,2 ± 0,88
95% ДИ	23,46 - 24,84	30,16 - 7,74	22,1 - 31,85	25,16 - 2,77	31,4 – 37,0
Достоверность контроль среда		0,0002			
Достоверность Контроль с ФБ			0,0092	0,0259	0,8712
Межгрупповые сравнения ANOVA			p Л-П 0,0001 p Л-М 0,0051		
ГГТП, Е/л	0,5 ± 0,045	0,3 ± 0,153	0,25 ± 0,096	0,15 ± 0,03	1,03 ± 0,033
95% ДИ	0,38 - 0,62	0,044 – 0,64	0,055 – 0,55	0,06 - 0,24	0,89 – 1,18
Достоверность Контроль среда		0,1053			
Достоверность Контроль с ФБ			0,7409	0,2283	0,0025
Межгрупповые сравнения ANOVA			p Л-П 0,0306 p Л-М 0,0123		

Условные обозначения: M ± m – среднее арифметическое значение и ошибка среднего, 95% ДИ - 95% доверительный интервал, p – уровень межгрупповой значимости. П – пируват, Л – лактат, М – малат.

Стоит отметить противоположное влияние биологически активных соединений на активность щелочной фосфатазы. Культивирование фибробластов с раствором пирувата ($p=0,009$) и малата ($p=0,025$) снижают активность данного фермента, в то время как раствор лактата не влияет на изменение активности щелочной фосфатазы во внеклеточной жидкости. При межгрупповом сравнении окислительно-восстановительных партнеров пируват – лактат ($p=0,0001$) отмечается более выраженное достоверно значимое ингибирующее влияние пирувата на активность щелочной фосфатазы. Известны сведения об участии щелочной фосфатазы фибробластов в процессах деградации коллагена, связанной с обеспечением ионов кальция, необходимых для активности коллагеназы [A.R. Ten Cate, S. Syrbu, 1974].

Наблюдается схожий по направленности эффект малых молекул на активность гамма-глутамилтранспептидазы: добавление к растущим фибробластам растворов пирувата и малата снижают активность данного фермента. Добавление раствора лактата ($p=0,002$) к питательной клеточной среде приводит к значимому увеличению активности гамма-глутамилтранспептидазы, что, вероятно связано прооксидантным эффектом лактата. Гамма-глутамилтранспептидаза [EC 2.3.2.2] представляет собой мембраносвязанный фермент, участвующий в метаболизме глутатиона и экспрессируется широким числом типов клеток. Этот фермент катализирует перенос глутамильной группы гаммакарбоновой кислоты к акцепторным молекулам пептидов и другим аминокислотам. Как известно, находясь на внешней стороне клеточной мембраны, гамма-глутамилтранспептидаза, в первую очередь, катализирует деградацию внеклеточного глутатиона, способствуя тем самым восстановлению составляющих аминокислот для последующего внутриклеточного его ресинтеза. Известно, что растущий в клеточной культуре фибробласт синтезирует и высвобождает лактат, способствуя усилению свободно-радикальных процессов через

взаимодействие с хелатными комплексами железа. Взаимосвязь между лактатом и свободными радикалами заключается в реакции Фентона, при которой лактат способствует комплексообразованию с ионами железа в диапазоне физиологического рН в присутствии перекиси водорода. Гамма-глутамилтранспептидаза в норме участвует в прооксидантно-антиоксидантном балансе, в условиях, создающихся при увеличении концентрации лактата, фермент также может оказывать прооксидантное действие и усиливать каскад свободнорадикальных реакций, запуская патологические для клетки процессы [M. Enoiu et al., 2000]. Кроме того, в литературе имеются сведения, что благодаря специфичности ферментативной реакции, подходящие пролекарства могут локально и селективно метаболизироваться посредством гаммаглутамилтранспептидазы, экспрессируемой в опухолевой ткани [A. Corti et. al., 2010].

Описанные изменения ферментативной активности внеклеточных процессов фибробластов находят свое подтверждение в активности ферментов внутри клетки. Далее мы оценили активность внутриклеточных ферментов фибробластов (таблица 6.6).

Добавление биологически активных соединений в культуральную среду фибробластов приводит к значимому снижению активности мембранносвязанного фермента 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. Пируват не оказывает влияния на изменение активности щелочной фосфатазы во внутриклеточной жидкости. При межгрупповом сравнении пар метаболитов лактат-пируват ($p=0,03$) отмечается значимое влияние лактата на активность щелочной фосфатазы, и как следствие, на

процессы расщепления коллагена, выражающееся в активизации коллагеназы ионами кальция.

Таблица 6.6 – Активность ферментов фибробластов в клеточном лизате после культивирования с малыми молекулами

	Контроль с ФБ M±m	Пируват M±m	Малат M±m	Лактат M±m	Оксалоацетат M±m
ЩФ, Е/л	0,8 ± 0,12	0,85 ± 0,14	0,65±0,02	1,9±0,058	0,55 ± 0,029
95% ДИ	0,43 - 1,17	0,39 - 1,31	0,56 - 0,74	1,7 - 2,1	0,46 - 0,64
Достоверность		0,7958	0,2544	0,0001	0,0804
Межгрупповые сравнения ANOVA		р Л-О 0,0001 р Л-П 0,0398		р Л-М 0,0002 р О-М <0,0001	
ГТП, Е/л	3,3 ± 0,15	1,6 ± 0, 35	2,05 ± 0,29	1,075±0,1	2,025 ± 0,19
95% ДИ	2,8 - 3,77	0,5 - 2,7	1,13 - 2,97	0,53 - 1,62	1,41 - 2,64
Достоверность		0,0040	0,0085	0,0001	0,0019
Межгрупповые сравнения ANOVA		Отсутствуют			
ГФД, Е/мл	0,284 ± 0,0026	0,22±0,00 01	0,143±0,0 01	0,4±0,000 9	0,35 ± 0,0002
95% ДИ	0,28 - 0,29	0,2194- ,2202	0,138 - 0,147	0,39 - 0,41	0,349 - 0,3503
Достоверность		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Межгрупповые сравнения ANOVA		р П-Л <0,0001 р П-М 0,0001	р О-М <0,0001 р О-Л 0,0001	р М-Л <0,0001 р П-О <0,0001	

Условные обозначения: M ± m – среднее арифметическое значение и ошибка среднего, 95% ДИ - 95% доверительный интервал, р – уровень межгрупповой значимости. П – пируват, Л – лактат, О – оксалоацетат, М – малат.

Рост фибробластов с добавлением растворов оксалоацетата и малата снижают активность щелочной фосфатазы в клеточном лизате, при межгрупповом сравнении этих окислительно-восстановительных партнеров ($p < 0,0001$) отмечается более выраженный ингибирующий эффект оксалоацетата, что, вероятно, свидетельствует о протективном действии этих метаболитов и участии в структурообразовании клеточных компонентов культуры фибробластов.

Наблюдается обратный по направленности эффект малых молекул на активность глицерофосфатдегидрогеназы внутри клеток по сравнению со значениями в надосадочной жидкости. Добавление в культуру фибробластов 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.

6.3 Определение жизнеспособности фибробластов при культивировании с биологически активными соединениями

Описанные молекулярные изменения метаболического профиля и ферментативной активности фибробластов под воздействием биологически активных соединений находят свое подтверждение в тестах, характеризующих жизнеспособность клеток. Является известным, что лактатдегидрогеназа – цитоплазматический фермент, и ее появление в культуральной жидкости наблюдается при нарушении целостности клеточной мембраны, что отражает сущность лактатдегидрогеназного теста. Соотношение активности этого фермента в надосадочной жидкости и

клеточном лизате отражает соотношение живых и поврежденных клеток в культуре фибробластов [E. Lopez et al., 2003].

При проведении лактатдегидрогеназного теста было выявлено, что различия показателей между контролем и экспериментальными образцами не значимы, что свидетельствует об отсутствии повреждающего или протективного действия на клетки оксалоацетата и малата в данном тесте. Полученные для пирувата и лактата данные представляют собой артефакт, поскольку эти метаболиты выступают субстратами лактатдегидрогеназной реакции.

Определение изменений митохондриальной активности при влиянии изучаемыми биологически активными соединениями на культуру клеток дермальных фибробластов было определено с использованием МТТ-теста, который широко используется как скрининговый метод измерения выживаемости клеток (таблица 6.7).

Таблица 6.7 – Результаты МТТ теста после инкубации фибробластов с малыми молекулами

	M±m	95%CI	p контроль	% жизнеспособных
Контроль	0,55±0,03	0,45-0,66		
Лактат	0,18±0,05	0,017-0,342	0,005	32,39%
Малат	0,71±0,07	0,46-0,88	0,019	127,31%
Оксалоацетат	0,74±0,09	0,49-0,99	0,028	133,83%
Пируват	0,52±0,06	0,34-0,71	0,55	95,09%

Согласно данным определения митохондриальной активности фибробластов добавление лактата в питательную среду снижает жизнеспособность клеток на 67,61% (p=0,005), пируват не оказывает достоверного влияния, сохраняя жизнеспособность клеток на уровне контроля, растворы малата и оксалоацетата достоверно значимо увеличивают

жизнеспособность фибробластов на 27,31% ($p=0,019$) и 33,83% ($p=0,028$) соответственно (рисунок 6.3).

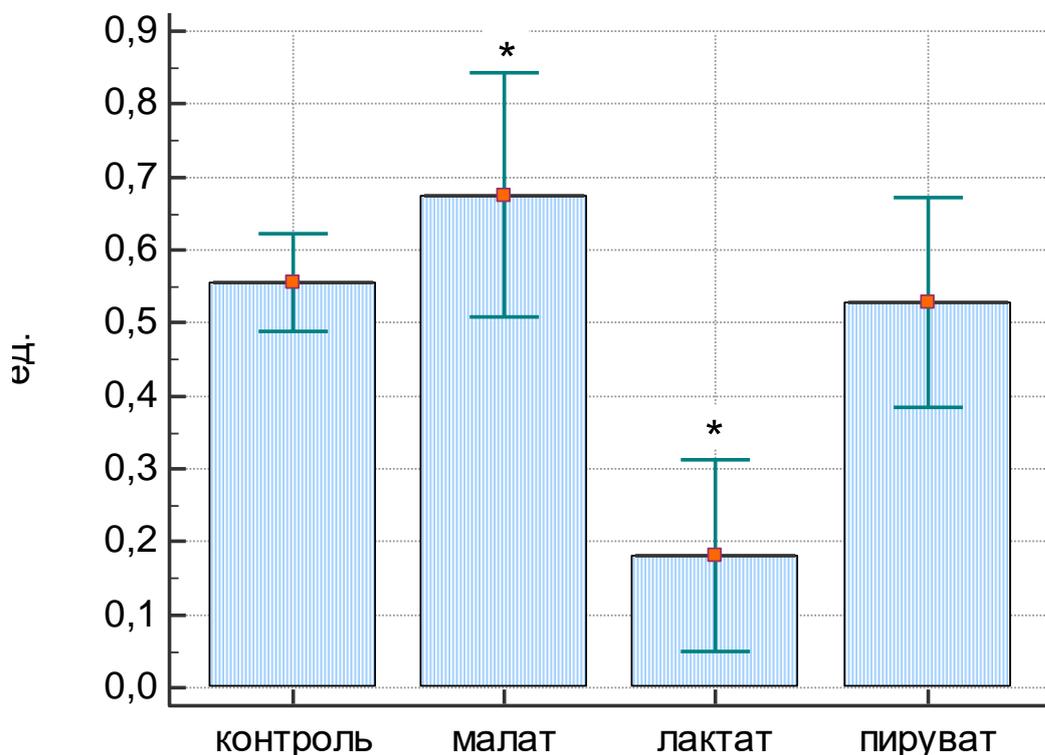


Рисунок 6.3 – Влияние малых молекул на жизнеспособность фибробластов (МТТ-тест), $*p<0,05$

Таким образом, отмечается стимулирующее действие молекул оксалоацетата ($p=0,028$) и малата ($p=0,019$) на первичную культуру дермальных фибробластов, что выражается в увеличении параметров жизнеспособности клеток. Отмечено, что экзометаболический профиль при добавлении оксалоацетата и малата является сопоставимым (рисунок 6.4), внесение этих молекул приводит к сонаправленному изменению показателей жизнедеятельности фибробластов, при этом наблюдается отличие в содержании пирувата и индексе глюкоза/пируват, которое регистрируется при добавлении оксалоацетата, что, однако, объясняется структурным переходом одного метаболита в другой ввиду близкой химической

организации, или особенностями регуляции активности ферментов цикла трикарбоновых кислот в условиях избытка продуктов.

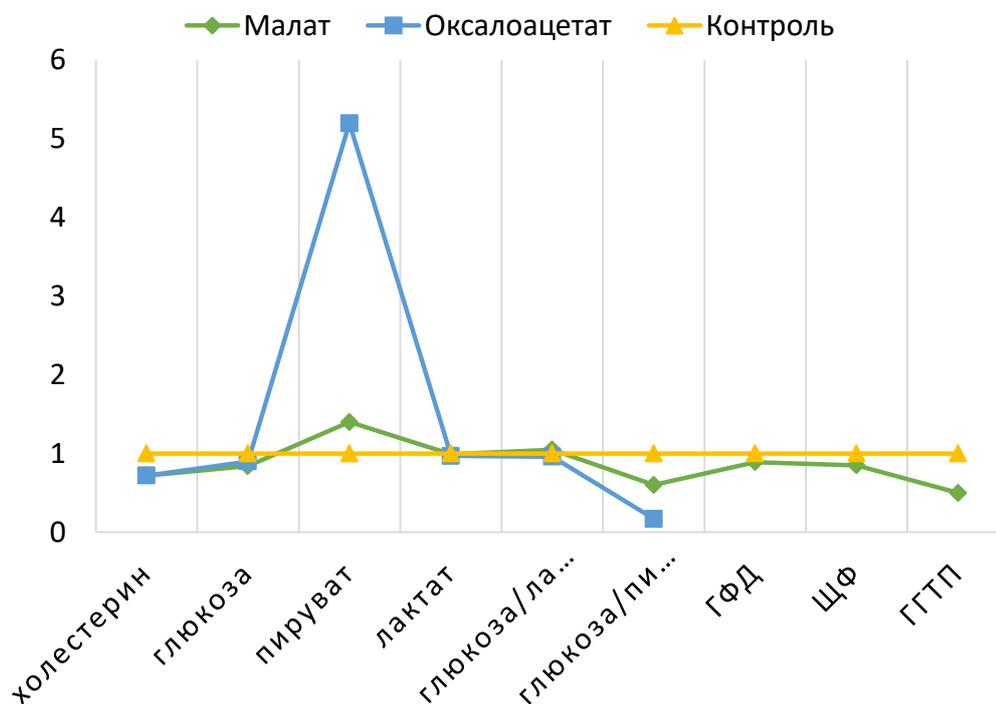


Рисунок 6.4 – Метаболический профиль фибробластов при добавлении малата и оксалоацетата. *Примечание:* изменение показателей представлено относительно контрольных значений

Культивирование фибробластов с добавлением лактата приводит к снижению процента жизнеспособных клеток и к характерному изменению метаболического профиля: увеличение лактата и ассоциированные с его накоплением проокислительные процессы, связанные с увеличением активности гамма-глутамилтранспептидазы, щелочной фосфатазы, которая ассоциируется с расщеплением коллагена. Наши эксперименты согласуются с литературными данными о том, что лактат способствует усилению свободно-радикальных процессов через взаимодействие с хелатными комплексами железа, что оказывает влияние на пролиферативный потенциал фибробластов [Wagner S. et al., 2004].

Рост клеток с раствором пирувата вызывал изменение внеклеточного профиля фибробластов, вместе с тем, можно заключить, что отмеченные параметры имели скомпенсированный характер и в целом не оказывали влияния на жизнеспособность клеток. Стоит отметить, что изучаемые молекулы не оказывали цитотоксического действия.

Было исследовано антиоксидантное действие пирувата на фибробластах человека, при котором эффект пирувата проявлялся в виде защиты от потери мембранного потенциала митохондрии. Также пируват способен активировать синтез генов, ответственных за нормализацию свободно-радикальных процессов, была показана выраженная антиоксидантная роль пирувата на культуре фибробластов и мезенхимальных стволовых клеток [P. Ramos-Ibeas et al., 2017].

Полученные изменения количественного состава метаболитного профиля и жизнеспособности фибробластов под влиянием биологически активных соединений свидетельствуют о возможности интермедиатов проявлять регуляторную роль и эффективно модулировать энергетические потоки клетки, сохраняя внутренний гомеостаз и даже оптимизируя метаболизм под влиянием внешних факторов. Являясь естественными компонентами эндосреды клетки, даже введенные экзогенно, названные вещества обладают низким профилем цитотоксичности и могут быть использованы в качестве терапевтических соединений, что, безусловно открывает перспективы дальнейших исследований.

Таким образом, клеточный метаболизм фибробластов является динамическим процессом, подверженным влиянию различных факторов, в том числе состава питательной среды - миллимолярного изменения содержания естественных интермедиатов – пирувата, лактата, оксалоацетата, малата. Интерпретация полученных данных позволяет предположить, что метаболиты, выделяемые фибробластами, отражают активность определенных процессов в клетках *in vivo*.

ГЛАВА VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На современном этапе развития науки в нашем арсенале имеется массив данных об образующихся белках в организме, которые систематизированы в различных научных информационных банках и библиотеках, однако мы все еще очень мало знаем о том, сколько метаболитов синтезируется и как белковые молекулы могут взаимодействовать с ними. С 2009 года все больше внимания уделяется малым молекулам, которые при различном внутриклеточном окружении могут изменять энергетический статус клетки и переключать обменные пути, что приводит к модуляции специфичных процессов, протекающих во внутри- и межклеточных пространствах [X.Li et al., 2009; R.H. Swerdlow, 2015; H.M. Wilkins et al., 2016]. Особый интерес при изучении метаболит - белковых взаимодействий представляют биологические процессы, которые служат ключевыми регуляторами для функций белка.

Перед нами возник ряд вопросов, на которые мы попытались ответить в нашей работе. Каковы молекулярные механизмы взаимодействия естественных интермедиатов с белковыми структурами организма? Как биологически активные соединения с определенной химической структурой, зарядом и пространственной конфигурацией могут влиять на белок-белковые взаимодействия и модулировать метаболические процессы? Возможно ли произвести визуализацию происходящих изменений на молекулярном уровне? Изменяется ли конформационная структура белковой молекулы после взаимодействия с естественными интермедиатами в различной концентрации и при изменении температурного фактора? Могут ли оказывать малые молекулы влияние на функционирование фермент-субстратных систем? И оказывают ли изучаемые малые молекулы влияние на

экзо- и внутриметаболические процессы *in vivo* в клеточной культуре фибробластов?

С этой целью нами был изучен полный спектр биологической активности, а также охарактеризованы белковые партнеры взаимодействия для пирувата, лактата, малата и оксалоацетата с использованием современных компьютерных методов оценки и дизайна химических соединений *in silico*.

Оценить возможность таких взаимодействий позволила нам компьютерная система Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS), с помощью которой возможно прогнозирование биологической активности вещества в зависимости от его химической структуры.

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 ишемически-реперфузионного повреждения и окислительного стресса благодаря усилению саркоплазматического ретикулярного транспорта Ca²⁺, увеличения продукции никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат-восстановленной формы для поддержания окислительно-восстановительного состояния глутатиона [R.T. Mallet, 2018].

Интересными являются полученные сведения в отношении ингибиторных свойств изучаемых биологически активных соединений для ряда ферментов (рисунок 7.1): пируватдегидрогеназы,

пируватдекарбоксилазы, лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, глицерол-3-фосфатдегидрогеназы и других.



Рисунок 7.1 – Смоделированные свойства малых молекул в отношении ингибции ряда ферментов и экспрессии генов

Предсказано ингибирующее влияние малых молекул на экспрессию гена TNF (фактор некроза опухоли) и на экспрессию гена EIF4E (эукариотический фактор инициации трансляции 4E). Интересным представляется тот факт, что естественные интермедиаты усиливают экспрессию гена TP53 – транскрипционного фактора, регулирующего клеточный цикл, а также усиливают экспрессию гена HMOX1, кодирующего стресс-индуцированный белок гемоксигеназу-1, который регулирует жизнеспособность, пролиферацию и дифференцировку многих типов клеток. Терапия пируватом

в исследовании Zager R.A. (2014) вызывала увеличение цитопротективной мРНК оксигеназы 1 и IL-10, избирательному снижению провоспалительных мРНК (например, MCP-1 и TNF- α) и улучшению уровней АТФ в ткани.

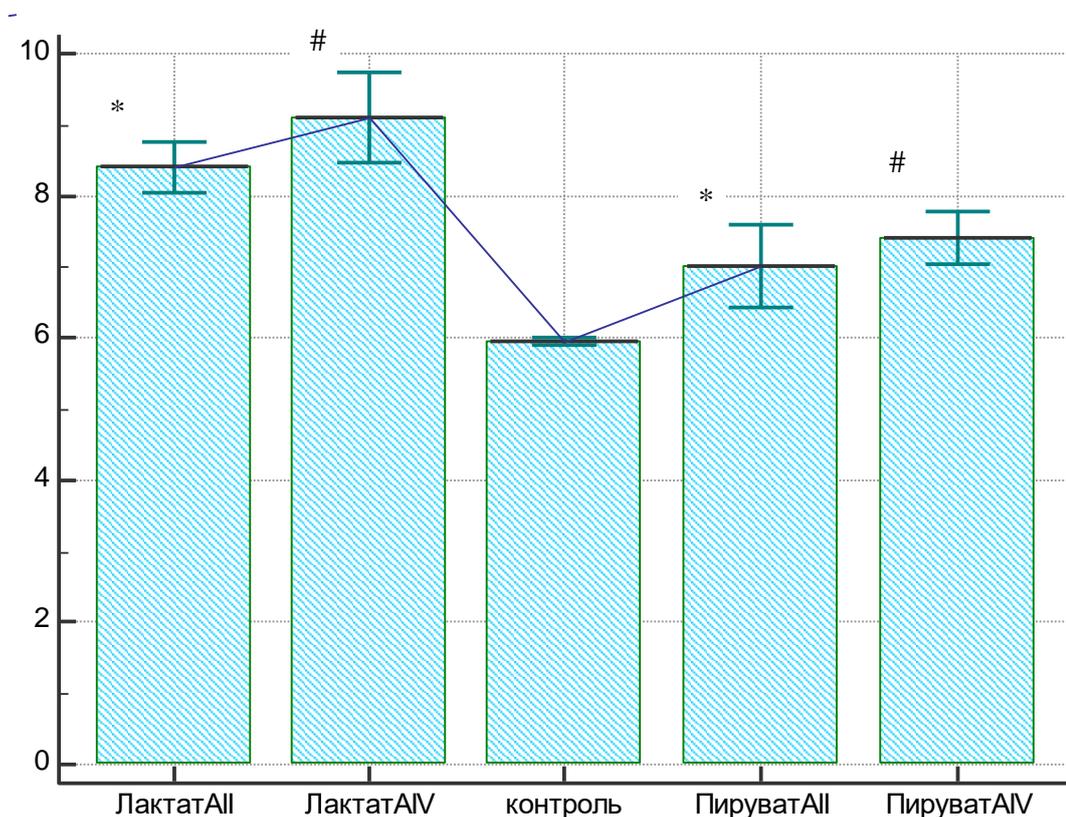
Далее мы обратились к поисковому инструменту - программе STITCH, в которой можно произвести компьютерное моделирование потенциальных белковых партнеров, с которыми могут взаимодействовать изучаемые малые молекулы. При использовании среднего порога достоверности $p > 0,4$ количество взаимодействий для пирувата составило 109, лактата - 384, малата - 120, оксалоацетата - 61. Отмечаются взаимодействия исследуемых малых молекул с белками, в том числе альбумин, перфорин 1, альфа-фетопротейн, цитохром b5, мускариновыми холинергическими, 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.

Спрогнозирована и экспериментально доказана роль лактата, пирувата и оксалоацетата в уменьшении развития нейродегенеративных процессов. Так, с открытием специфического рецептора MTRNR2, который уменьшает продукцию бета-амилоидного пептида при болезни Альцгеймера [M. Zhang et al., 2018], вероятно, лактат можно рассматривать как своего рода медиатор или даже гормон, участвующий в таких сложных процессах, как формирование памяти и нейропротекция [P. Proia et al., 2016]. Пируват оказывает нейропротекторное действие, используя механизм действия уменьшения окислительно-восстановительного отношения, и сдерживая

активацию апоптотических событий, таких как высвобождение митохондриального цитохрома с и фрагментация каспазы-3 и PARP. За счет повышения активности пируватдегидрогеназы, пируват может ускорять свой собственный метаболизм и, таким образом, восстанавливать клеточные уровни АТФ в постишемических астроцитах [A.V. Sharma, 2008; N. Moro et al., 2016]. Благодаря этим спрогнозированным и экспериментально подтвержденным свойствам, пируват может применяться в качестве терапевтического средства для лечения инсульта, а также острых неврологических расстройств [Frank D. et al., 2019]. Системное введение оксалоацетата может представлять собой новую нейропротективную стратегию благодаря минимизации воздействия глутамата на ткани головного мозга после ишемического инсульта, а также этот интермедиат был назван биоэнергетическим лекарственным препаратом, специально разработанным для повышения уровня энергии клеток [F. Campos et al., 2012].

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.V. 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 разновидности 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.



$p < 0,0001$

* $p < 0,001$

Рисунок 7.2 – Влияние пирувата и лактата на гликопротеины А (время агглютинации, сек.)

Полученные результаты инкубации гликопротеинов А с лактатом и пируватом свидетельствуют об однонаправленных различиях во времени образования белок-белковых комплексов и степени интенсивности их взаимодействия по сравнению с контрольными значениями и при межгрупповом сравнении. Углеводные компоненты антигена А по-разному отвечают на влияние биологически активными соединениями пируватом и лактатом (рисунок 7.2). При добавлении лактата в экспериментальную среду 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.

По-другому отвечали на воздействие пируватом и лактатом антигенные детерминанты В – однонаправленно с антигенами А, но с меньшей интенсивностью. При добавлении пирувата в эксперимент 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% ($p < 0,01$).

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.

Выявленные отличия, вероятно, связаны со структурным различием углеводных детерминант гликопротеинов А и В. Различные гликаны на детерминантной олигосахаридной цепочке белковой молекулы составляют отличительные характеристики строения антигенов [К. Saliminejad et al., 2018]. Полученные данные показали, что время образования комплексов гликопротеина А изменяется активнее вследствие большего сродства к эпитопу А – N-ацетилгалактозамину, чем D-галактозе гликопротеина В. Особенность строения эритроцитов АВ(IV) группы крови – наличие двух антигенных детерминант и их межмолекулярные взаимодействия с малыми молекулами привело к ответу, выраженному одинаковой степенью интенсивности детерминант гликопротеинов А и В.

Естественные антитела представляют собой иммуноглобулины класса М, и по-разному отвечают на воздействие естественными 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%. Таким образом, лактат в большей степени оказывает воздействие на иммуноглобулины, вызывая их модификацию и уменьшая их аффинность. Анти-В антитела подвержены более сильному влиянию изучаемых малых молекул, что вероятно связано с их большей конформационной перестройкой, в отличие от анти-А антител, о чем свидетельствует изменение их степени агглютинации.

Мы предполагаем, что изучаемые биологически активные соединения изменяют прочность связывания углеводных компонентов антигенов к антигенсвязывающим сайтам естественных антител, что приводит через модуляцию их конформации к изменению специфичности белок-белкового взаимодействия и их микроокружения, связанного с построением

межмолекулярных связей углеводных компонентов гликопротеинов с малыми молекулами. Обращает на себя внимание, что лактат во всех сериях экспериментов 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 A(II) и AB(IV) групп.

Важным этапом является визуализация белковых комплексов, а также количественная оценка в условиях действия лактата и пирувата с применением лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. В результате проведения серии экспериментов с применением естественных интермедиатов лактата и пирувата, антигенов A и B системы групп крови АВ0 и специфичных моноклональных конъюгированных антител, меченных флуоресцеинизотиоционатом (ФИТЦ) с использованием конфокального микроскопа были получены данные, сопоставимые с экспериментами агглютинации *in vitro*. Нами были сделаны микрофотографии белок-белкового взаимодействия после инкубации с малыми молекулами в режимах основного и флуоресцентного рассеивания с последующей математической обработкой полученных данных.

В режиме основного рассеивания 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 пирувата и лактата на гликопротеин В вызвало схожее ингибирующее и сонаправленное влияние на количество образованных комплексов ($p=0,0001$) в сравнении с контролем при внесении лактата ($p<0,0001$) и пирувата ($p<0,0001$), для остальных параметров отличия воздействия пирувата от лактата не были выявлены.

Белок-белковое взаимодействие в режиме основного рассеивания носит достаточно точный характер, однако, не позволяет исключить ряд неспецифических взаимодействий, которые могут вносить вклад в видимый эффект образования антиген-антительных комплексов. 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.

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 приводит к достоверному снижению средней интенсивности зеленого пикселя в сравнении с контролем при этом эффект лактата и пирувата соизмерим по выраженности и не отличим друг от друга. Наблюдаемое отличие в реакции белковых детерминант на внесение биологически активных соединений, вероятно, может быть объяснено с позиции химической структуры: антигены А и В имеют общее вещество-предшественник – фукозу, однако отличаются терминальными детерминантами: у антигена А - N-ацетилгалактозамин, у антигена В – Д-галактоза.

Вероятно, влияние метаболитов связано с взаимодействием с ионогенными структурами гликановых детерминант, что приводит к изменению скорости образования белок-белковых комплексов. Кетокислота пируват проявляет кислые свойства, а карбоксильная группа обуславливает отрицательный заряд молекулы. Гидроксикислота лактат, в структуре которой находится гидроксильная группа, что обуславливает кислые

свойства и легкость вступления в различные химические реакции. Так как мембрана эритроцитов обладает отрицательным зарядом, то при взаимодействии с отрицательно заряженными малыми молекулами происходит изменение характера аффинитета связи белковых молекул, в том числе действие лактата более выраженное во всех сериях экспериментов.

Визуализация полученных белок-белковых комплексов с использованием конфокального микроскопа показывает роль пирувата и лактата в межмолекулярных процессах. Изучаемые малые молекулы, вероятно, взаимодействуют с активными функциональными группами антигенных детерминант, влияют на микроокружение центра связывания гликановой части антигена, вызывая конформационные перестройки белковой молекулы в целом, оказывая влияние на процессы узнавания и взаимодействия антигенов с естественными антителами.

Серия исследований *in vitro* по изучению влияния биологически активных соединений с использованием экспериментальной модели гликопротеинов А и В и естественных агглютининов α и β показала участие изучаемых малых молекул в белок-белковых взаимодействиях. Методами молекулярного зондирования и конфокальной микроскопии выявлено сонаправленное действие пирувата и лактата на антигенные детерминанты А и В, однако влияние лактата более выражено, чем пирувата, что также было спрогнозировано в программах PASS и STITCH. Отмечено влияние на гликопротеин А в удлинении времени образования белок-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. 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. В экспериментах с естественными антителами выявлено, что β антитела подвержены более сильному влиянию как пирувата, так и лактата, что проявляется в разнонаправленном изменении степени агглютинации, что вероятно связано с их большей конформационной перестройкой, в отличие от α антител.

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. В качестве объекта нашего исследования были выбраны каталитические системы: глицерофосфатдегидрогеназная, лактатдегидрогеназная, малатдегидрогеназная.

Каталитические белки, которые могут выступать в качестве сигнальных молекул, представляют собой интересную область для изучения взаимодействия белок-лиганд, поскольку они проявляют высокую чувствительность к воздействию на них внешними стимулами, такими как эндогенные метаболиты, малые молекулы [M.Hörner, W.Weber, 2012].

Молекулы малой массы, являясь лигандами более крупных структур, связываются с активными и аллостерическими центрами белков с помощью ковалентных и нековалентных связей, в результате этого может изменяться конформация белковой молекулы, а значит, и перемена функциональных свойств белка [H.A. Flaxman, S.M. Woo, 2018]. Установление факта взаимодействия малой молекулы с белком стало более доступно с

применением методов флюоресценции (как эндогенной, так 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 изучаемых биологически активных соединений эндогенного происхождения в диапазоне концентраций с использованием метода дифференциальной

сканирующей флуориметрии, а также смогли оценить его химическую и термическую стабильность с использованием внутренней флуоресценции триптофана или тирозина при длинах волны 330 и 350 нм. Полученные данные показывают, что при малой разнице в температурах плавления фермента отмечается различное состояние комплексов с малыми молекулами, что проявляется различной глубиной пиков.

Термостабильность молекулы изменяется под влиянием диапазона концентраций (0,5 мкМ – 16 мкМ) растворов пирувата, лактата, оксалоацетата и пирувата, что отображается в изменении глубины образованных пиков на кривой первой производной (рисунок 7.3). Малые молекулы в конечной концентрации 16 мкМ снижают термостабильность фермента, разворачивая конформационную структуру глицерофосфатдегидрогеназы, а концентрации лигандов 0,5 мкМ проявляют протективное действие и переводят в наиболее выгодное каталитически активное – свернутое – состояние.

Интересным является тот факт, что данная тенденция сохраняется для всех концентраций лигандов и носит дозозависимый характер. 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, окислительно-восстановительного партнера оксалоацетата – максимальные проявления, что свидетельствует о различном конформационном состоянии исследуемых комплексов белок-лиганд.

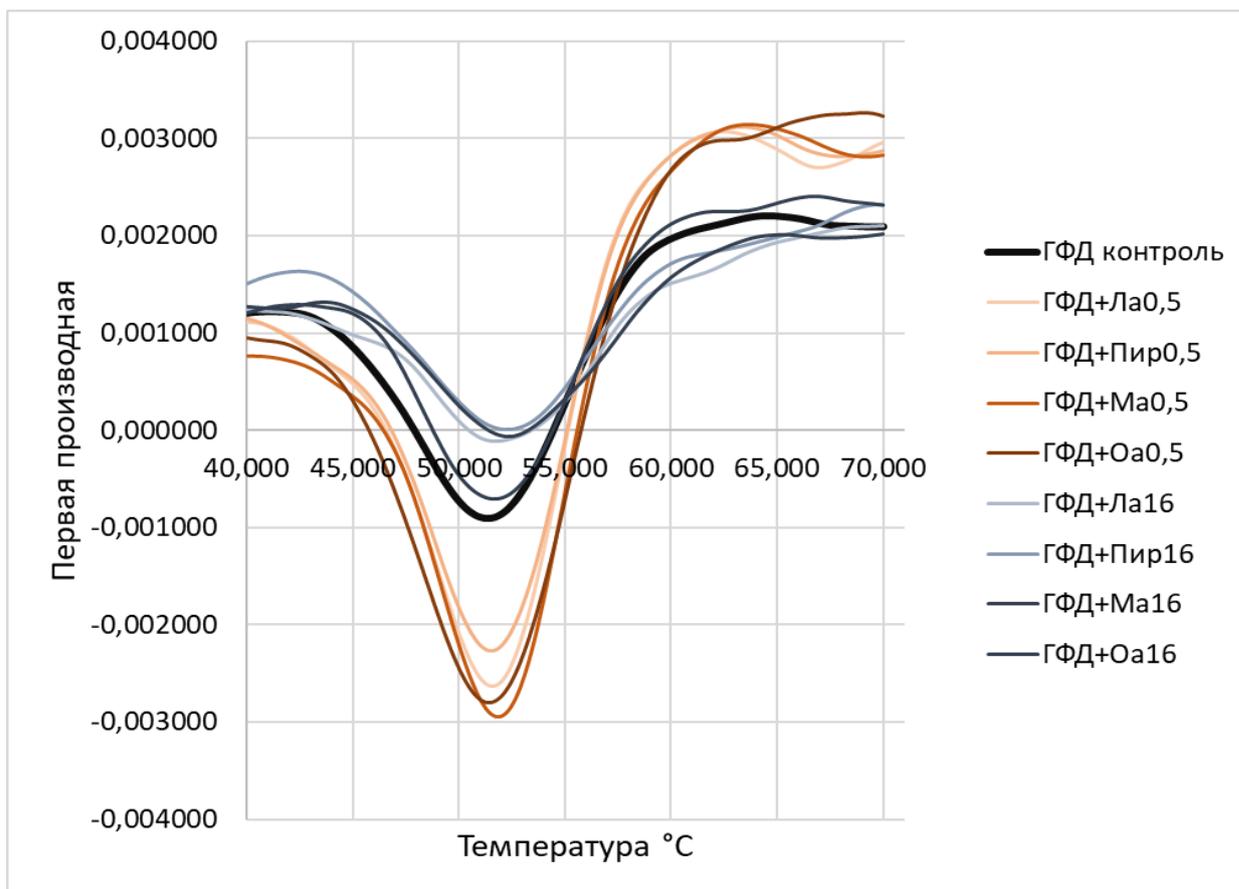


Рисунок 7.3 – Влияние оксалоацетата, пирувата, малата и лактата в конечной концентрации 0,5 мкМ и 16 мкМ на глицерофосфатдегидрогеназу

Нами была проанализирована температура начала плавления и точка температурного перегиба молекулы белка лактатдегидрогеназы при постоянной концентрации 1 мкМ после инкубации с естественными интермедиатами (оксалоацетат, пируват, малат, лактат) в изменяющейся конечной концентрации (от 0,5 мкМ до 16 мкМ). В ходе эксперимента изменялась общая амплитуда сигнала флуоресценции в процессе нагревания фермента. Действие высоких температур приводят к изменению микроокружения молекулы белка, в том числе к конформационной перестройке его ароматических остатков, следствием чего является изменение упорядоченной структуры белка и его разворачивание. Взаимодействие белка с малыми молекулами в концентрации 16 мкМ приводит преимущественно к развернутой конформации молекулы белка, что

проявляется в снижении его термостабильности: снижение температуры начала плавления, более быстрое наступление точки температурного перегиба. Напротив, добавление изучаемых биологически активных соединений в минимальной концентрации 0,5 мкМ способствует к сворачиванию конформационной структуры белка, что приводит к повышению термостабильности лактатдегидрогеназы: температура начала плавления белка увеличилась в сравнении с контролем, а также произошел сдвиг наступления температурного перегиба. Таким образом, использование современных методов исследования в эксперименте *in vitro* выявило разнонаправленное влияние изучаемых биологически активных соединений на процессы формирования пространственной структуры белковых молекул лактатдегидрогеназы и глицерофосфатдегидрогеназы.

Методами дифференциальной сканирующей флуориметрии и микрокапиллярного термофореза нами был установлен факт взаимодействия белковой молекулы с лигандами эндогенного происхождения и показано наличие изменения конформационной стабильности ферментов при воздействии на них биологически активными соединениями. Также, нами было выявлено, что малые концентрации метаболитов обладают протекторным действием на структуру молекулы белка, увеличивая устойчивость фермента к влиянию температуры, а высокие концентрации, напротив, приводят к снижению конформационной стабильности.

Естественные интермедиаты могут взаимодействовать с различными белками ферментативно в качестве субстратов и продуктов или аллостерически в качестве кофакторов или лигандов. Эти взаимодействия могут изменять материальный и энергетический поток в биохимических реакциях, а также регулировать биологические процессы посредством сигнальных каскадов. В свою очередь, активность ферментативных систем может регулировать синтез макроэргических соединений, и, в то же время, благодаря обратной связи может менять метаболический путь образования

АТФ при накоплении избыточного количества конечных продуктов или избыточной активности регуляторных белков [Д.А. Олейников с соавт., 2015].

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

Серия экспериментов по изучению влияния биологически активных соединений на функционирование глицерофосфатдегидрогеназной системы показала разнонаправленное влияние изучаемых малых молекул в диапазоне концентраций 1 мМ – 1 мкМ. При анализе полученных данных дозозависимого влияния малых молекул на глицерофосфатдегидрогеназную систему 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. 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.

Далее мы изучили влияние оксалоацетата и малата в диапазоне концентраций 5 мМ – 1 мкМ 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.

Следующим этапом стало изучение влияния пирувата и лактата в микромолярных концентрациях на функционирование каталитической системы малатдегидрогеназы – лактатдегидрогеназы. Известным является сходное строение молекул белка двух дегидрогеназ, а также их каталитический механизм действия: окисление-восстановление общих 2-кетокислот и 2-гидроксикислоты с НАД в качестве кофермента [А. Kazuhito et al., 2001]. Отмечается дозозависимое влияние пирувата на функционирование изучаемой системы ферментов: пируват в 0,1 мкМ – 10 мкМ концентрациях обладает активирующим действием, в наименьшей концентрации 0,01 мкМ достоверно ингибирует образование фермент-субстратного комплекса малатдегидрогеназы. В отношении второго фермента системы – лактатдегидрогеназы, отмечается несколько отличающееся дозозависимое влияние: малых концентраций лиганда (0,01 мкМ – 1 мкМ) не достаточно для полноценного функционирования фермент-субстратного комплекса, происходит конкуренция за истинный субстрат с малатдегидрогеназой, что приводит к снижению активности лактатдегидрогеназы, и вероятно изменению конформационной структуры белковой молекулы. Лишь пирувата в концентрации 10 мкМ достаточно для покрытия субстратной потребности лактатдегидрогеназы и адекватного функционирования двух ферментативных систем, что выражается в

активирующем действии как малатдегидрогеназы, так и истинного фермента для изучаемых лигандов лактатдегидрогеназы.

В литературе имеются сведения о структурном сходстве между собой дегидрогеназ Homo sapiens (глицерофосфатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, алкогольдегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы и других): примерно на 20% имеют идентичные последовательности и содержат соответствующую складку Россмана для связывания кофактора, большинство из них обнаруживаются в открытых и закрытых конформациях, являются димерами, и можно обнаружить роль общего основания – лизина - в активном сайте [M. Gonzalez et al., 2018; L.S. Mudy et al., 2019]. При проведении сравнительного анализа влияния изучаемых лигандов эндогенного происхождения на фермент-субстратное взаимодействие каталитических белков отмечается разнонаправленное действие изучаемых естественных интермедиатов (пируват, оксалоацетат, лактат и малат) в конечной концентрации 10 мкМ на глицерофосфатдегидрогеназу и лактатдегидрогеназу: активирующее действие лигандов на лактатдегидрогеназную систему и ингибирующее влияние на глицерофосфатдегидрогеназную систему. Сходные по строению кетокислоты пируват и оксалоацетат обладают большим действием на активность лактатдегидрогеназы, что вероятно, связано с конформационной структурой белковой молекулы и доступностью активного центра для связывания с низкомолекулярными лигандами. В свою очередь, гидроксикислоты малат и лактат, возможно, нарушают электростатические взаимодействия аминокислотных последовательностей боковых цепей в активном сайте фермента, и снижают каталитическую активность глицерофосфатдегидрогеназной системы.

Полученные данные свидетельствуют о влиянии малых молекул (пирувата, лактата, оксалоацетата и малата) на фермент-субстратное взаимодействие глицерофосфатдегидрогеназной, лактатдегидрогеназной,

малатдегидрогеназной каталитических систем. Выявлено дозозависимое действие оксалоацетата и малата на функционирование лактатдегидрогеназы, пирувата на работу малатдегидрогеназы.

Серии экспериментов *in vitro* показали влияние изучаемых естественных интермедиатов на белок-белковое взаимодействие, изолированные каталитические белки, и на функционирование фермент-субстратных систем, что приближает нас к раскрытию роли низкомолекулярных лигандов. Внутриметаболические взаимодействия образуют переплетенную сеть, в которой метаболиты и ферменты непосредственно регулируют активность их собственного пути, а также активность более отдаленных путей. Тем не менее, *in vivo* различные возможные взаимодействия естественных метаболитов с внутри- и внеклеточными структурами до сих пор не исследована. Следующим этапом нашей работы является выяснение роли малых молекул в определении жизнеспособности клеточной культуры дермальных фибробластов.

В клеточной культуре нормальный фибробластов человека нами были изучены особенности протекания метаболических процессов, функционирование фермент-субстратных систем, а также изменение пролиферативной активности фибробластов в условиях воздействия биологически активными соединениями эндогенного происхождения.

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*.

Интересно отметить, что 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 оценки индекса глюкоза/лактат выявили следующие особенности: наиболее высокий индекс характерен для малата, а самый низкий – для лактата ($p=0,0014$). Обращает на себя внимание достоверное отличие полученного соотношения в парах между всеми метаболитами, указывая 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 пирувата в оксалоацетат, 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% ($p < 0,0001$). Сравнение окислительно-восстановительных партнеров пирувата и лактата ($p = 0,01$), которые добавляли к фибробластам, показывает достоверно значимое разнонаправленное действие этих биологически активных соединений. При межгрупповом сравнении пар метаболитов пируват – малат ($p = 0,0029$), отмечается достоверно значимое увеличение пирувата в надосадочной жидкости фибробластов для обоих метаболитов, однако трактовать изменения содержания пирувата при культивировании с данной молекулой представляется затруднительным. 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.

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 на щелочной фосфатазе: 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: пируват и малат снижают активность данного фермента, однако, в данном случае добавление лактата приводит к значимому увеличению активности фермента ($p = 0,02$).

Такой прирост активности гамма-глутамилтранспептидазы может быть объяснен с позиции прооксидантного эффекта лактата. Показано, что растущий в культуре фибробласт синтезирует и высвобождает лактат,

способствуя усилению свободно-радикальных процессов через взаимодействие с хелатными комплексами железа. В норме гамма-глутамилтранспептидазе присущи противорадикальные эффекты, но в условиях, создающихся при увеличении концентрации лактата фермент также может оказывать прооксидантное действие и усиливать каскад свободнорадикальных реакций, запуская патологические разрушительные для клетки процессы [G. Koenig, S.Seneff, 2015].

Описанные молекулярные изменения процессов жизнедеятельности фибробластов находят свое подтверждение в тестах, характеризующих жизнеспособность клеток. В соответствии с представленными результатами лактат снижает жизнеспособность клеток на 67,61% ($p=0,005$), пируват не оказывает достоверного влияния, сохраняя жизнеспособность клеток на уровне контроля, малат и оксалоацетат увеличивают жизнеспособность фибробластов на 27,31% ($p=0,019$) и 33,83% ($p=0,028$) соответственно.

Определение цитотоксичности изучаемых молекул проводилось при помощи лактатдегидрогеназного теста. Выявлено, что различия показателей между контролем и экспериментальными образцами не достоверны, что свидетельствует об отсутствии цитотоксичности биологически активных соединений: лактата, оксалоацетата, малата. Полученные для пирувата данные представляют собой артефакт, поскольку пируват выступает субстратом катализируемой лактатдегидрогеназой реакции.

Показано стимулирующее действие оксалоацетата ($p=0,028$) и малата ($p=0,019$) на культуру нормальных фибробластов человека, что выражается в увеличении жизнеспособности клеток. Метаболитный профиль при добавлении оксалоацетата и малата является сопоставимым, внесение этих молекул приводит к сонаправленному изменению показателей жизнедеятельности фибробластов. Внесение лактата в культуру фибробластов приводит к снижению процента жизнеспособных клеток и к характерному изменению метаболического профиля: ассоциированные с

увеличением лактата прооксидантные процессы. Изменения метаболизма при добавлении пирувата имели скомпенсированный характер и не оказывали влияния на жизнеспособность клеток.

Таким образом, показанные изменения количественного состава метаболитного профиля и жизнеспособности фибробластов под влиянием малых молекул свидетельствует о возможности интермедиатов проявлять регуляторную роль и эффективно лавировать энергетические потоки клетки, сохраняя внутренний гомеостаз и даже оптимизируя метаболизм под влиянием внешних факторов. Являясь естественными компонентами эндосреды клетки, даже введенные экзогенно, названные вещества обладают низким профилем цитотоксичности и могут быть использованы в качестве терапевтических соединений, что, безусловно открывает перспективы дальнейших исследований.

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 возможных терапевтических препаратов, перспективного инструмента для изучения

молекулярных основ здоровья и болезней, а также с позиции новых подходов современной медицины. (рисунок 7.4).

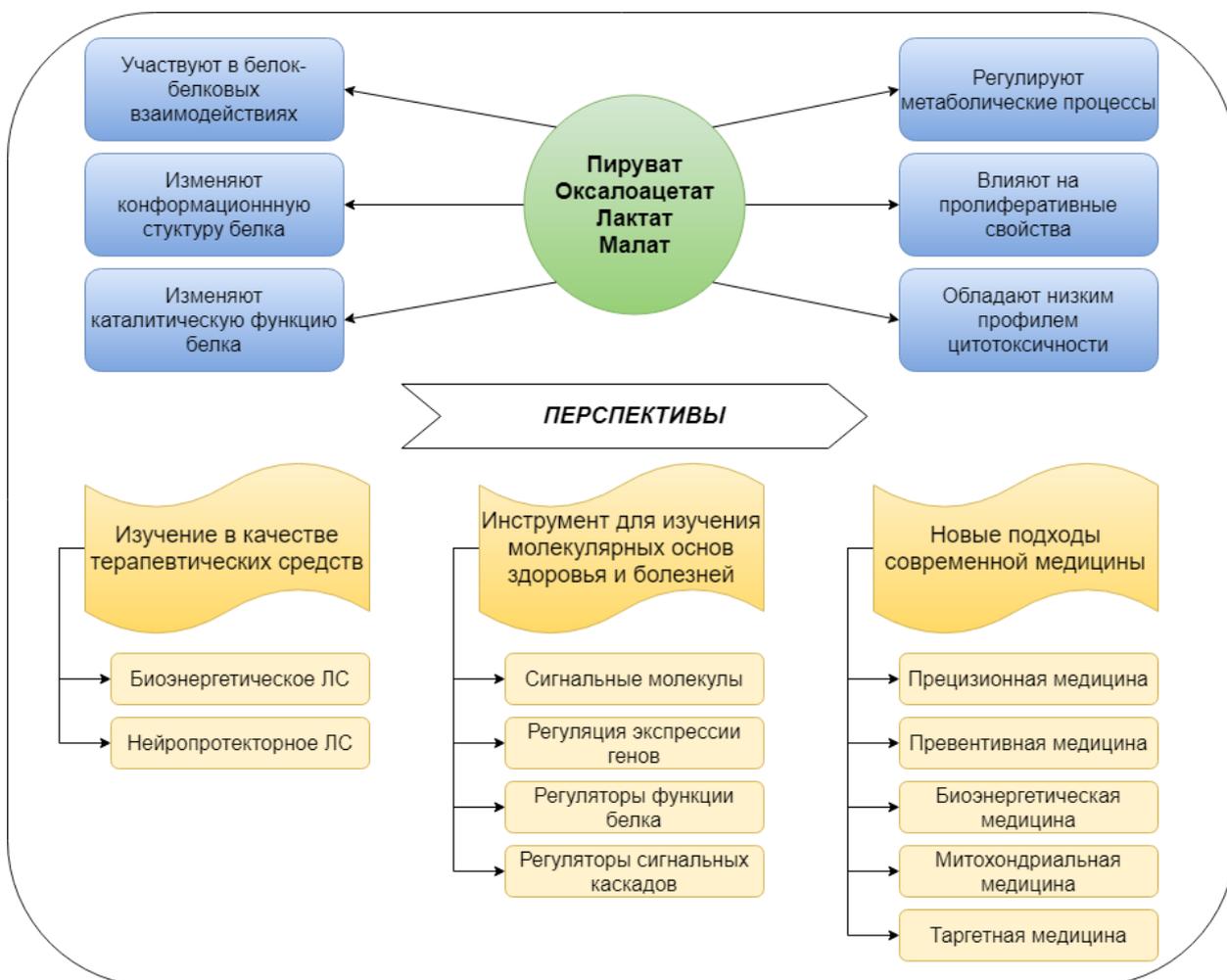


Рисунок 7.4 – Перспективы применения малых молекул (авторский рисунок)

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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

ГГТП – гамма-глутамилтранспептидаза

ГФД – глицерофосфатдегидрогеназа

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

НАД⁺ – никотинамидадениндинуклеотид окисленный

НАДН – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

TP53 - ген транскрипционного фактора белка p53

ФАД – флавинадениндинуклеотид

ЩФ – щелочная фосфатаза

EIF4E - эукариотический фактор инициации трансляции 4E

EPO – эритропоэтин

HIF-1 α - индуцируемый гипоксией фактор-1

HMOX1 – ген гемоксигеназы

MPC - митохондриальный переносчик пирувата

NRF - ядерный респираторный фактор

PASS - Prediction of Activity Spectra for Substances - Прогноз спектров активности веществ

PDK4 - пируватдегидрогеназ-киназы 4

SLC - семейство транспортёров растворённых веществ

STITCH - Search Tool for Interacting Chemicals - Инструмент поиска взаимодействующих химических веществ

TNF - фактор некроза опухоли

TR α 1 - рецептор гормона щитовидной железы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антигены АВ0 системы / Ф. Н. Гильмиярова, В. М. Радомская, Е. А. Шахнович [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2013. – № 8. – С. 21–28.
2. Биомолекулы и взаимодействия 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.
3. Биохимические исследования в диагностике и прогнозировании клинического течения острого гематогенного остеомиелита у детей / С. Н. Гисак, В. И. Руднев, Т. Р. Иванова [и др.] // Научно-медицинский вестник Центрального Черноземья. – 2008. – № 33. – С. 9–11.
4. 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.
5. Влияние пирувата на взаимодействие антител с группоспецифичными антигенами эритроцитов / Ф. Н. Гильмиярова, В. М. Радомская, О. А. Гусякова [и др.] // Биомедицинская химия. – 2015. – № 1. – С. 132–140.
6. Воронкова, А. С. Персонализированная оценка особенностей митохондриальной ДНК / А. С. Воронкова, Н. А. Литвинова, В. С. Сухоруков // Медицинский алфавит. – 2017. – Т. 4, № 28(325). – С. 24–29.
7. Генетические вариации митохондриальной днк при отсутствии признаков гипоксической недостаточности / Н. А. Литвинова, В. С. Сухоруков, Е. А. Николаева [и др.] // Медицинский алфавит. – 2018. – Т. 2, № 31(368). – С. 45–49.

8. 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. – Т. 64, № 4. – С. 216–220.

9. 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.

10. Дисметаболическая нефропатия у детей с наследственной дисплазией соединительной ткани / Э. А. Юрьева, В. В. Длин, Е. С. Воздвиженская [и др.] // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2020. – Т. 65, № 1. – С. 71–76.

11. Довжикова, И. В. Активность процессов образования НАДФ в плаценте при беременности, осложненной герпетической инфекцией / И. В. Довжикова, М. Т. Луценко // Якутский медицинский журнал. – 2009. – № 2(26). – С. 159–160.

12. Ерлыкина, Е. И. Особенности мембранной регуляции ферментов мозга при адаптации к изменяющимся условиям жизнедеятельности организма : специальность 03.00.04 «Биохимия» : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук / Ерлыкина Елена Ивановна ; Нижегород. гос. ун-т им. Н.И. Лобачевского. – Нижний Новгород, 2006. – 45 с.

13. Жирнов, О. П. Rh-зависимые перестройки в структуре вируса гриппа / О. П. Жирнов // Вопросы вирусологии. – 2014. – Т. 59, № 3. – С. 41–46.

14. Зиганшина, А. А. Митохондриальная дисфункция у детей с рефлюкс-эзофагитом / А. А. Зиганшина, В. С. Сухоруков, В. П. Булатов // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2017. – Т. 62, № 2. – С. 88–93.

15. Зимин, Ю. В. Надмолекулярная регуляция активности некоторых оксидоредуктаз клетки в норме и патологии / Ю. В. Зимин, С. П. Сяткин,

Т. Т. Березов // Вопросы медицинской химии. – 2001. – Т. 47, № 3. – С. 279–287.

16. Зубкова, Л. П. «Традиционные» и «нетрадиционные» подходы к оценке биоэнергетических механизмов в медицине и биологии / Л. П. Зубкова, В. А. Бочаров // Bioenergetics in Medicine and Biology. – 2017. – № 1(1). – С. 5–15.

17. Исследование комплекса рибосомного белка 11 бактерии *thermotoga maritima* со специфическим фрагментом МРНК / А. О. Михайлина, В. А. Балобанов, О. С. Костарева [и др.] // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2017. – Т. 2, № 1. – С. 330–334.

18. Ключевые показатели углеводного обмена у клинически здоровых людей с различной групповой принадлежностью крови по системе АВ0 / Ф. Н. Гильмиярова, О. А. Гусякова, Н. С. Нефедова [и др.] // Казанский медицинский журнал. – 2013. – Т. 94, № 5. – С. 672–674.

19. 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.

20. Компьютерное прогнозирование спектров биологической активности химических соединений: возможности и ограничения / Д. А. Филимонов, Д. С. Дружиловский, А. А. Лагунин [и др.] // Biomedical Chemistry: Research and Methods. – 2018. – Т. 1, № 1. – e00004.

21. Кржечковская, В. В. Мембраносвязанный цитохром b5 и метаболизм липидов (реакции не связанные с участием системы цитохрома р-450) / В. В. Кржечковская, А. А. Кубатиев, Ю. И. Наумов // Мембраны. Серия. Критические технологии. – 2004. – № 2(22). – С. 9–21.

22. Культивирование фибробластов человека для диагностики наследственных болезней / К. Н. Гринберг, В. И. Кухаренко, В. Н. Ляшко [и др.] // Методы культивирования клеток: Сборник научных трудов. – Наука, 1988. – С. 250–257.

23. Лактат: есть ли тупик метаболизма? / Н. А. Колотьева, В. И. Потехина, И. В. Горбачева [и др.] // Наука молодых - ERUDITIO JUVENIUM. – 2016. – № 1. – С. 28–32.

24. Лысиков, Ю. А. Углеводы в клиническом питании / Ю. А. Лысиков // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2013. – № 2. – С. 89–110.

25. Льюис, С. М. Практическая и лабораторная гематология / С. М. Льюис, Б. Бэйн, И. Бэйтс ; пер. с англ. под ред. А. Г. Румянцева. – Москва : ГЭОТАР – Медиа, 2009. – 672 с.

26. Метаболический профиль 0(I) – АВ(IV) групп крови / Ф. Н. Гильмиярова, В. М. Радомская, Е. А. Шахнович [и др.] // Медицинский альманах. – 2012. – № 1(20), март. – С. 174–178.

27. Метод конфокальной лазерной флуоресцентной микроскопии для контроля клеток костного мозга / В. П. Захаров, Л. Т. Волова, П. Е. Тимченко [и др.] // Вестник Самарского государственного аэрокосмического университета им. академика С.П. Королёва (национального исследовательского университета). – 2013. – № 2(40). – С. 194–200.

28. Минорные компоненты метаболизма в изучении белок-белковых взаимодействий / Ф. Н. Гильмиярова, В. М. Радомская, Е. А. Рыскина [и др.] // Медицинский альманах. – 2013. – № 2(26), май. – С. 181–184.

29. Минорные компоненты метаболизма в регуляции белок-белковых взаимодействий / Ф. Н. Гильмиярова, В. М. Радомская, Е. А. Рыскина [и др.] // Медицинский альманах. – 2013. – № 2. – С. 26.

30. Митохондриальная ДНК как фактор развития глаукомной оптической нейропатии / И. Р. Газизова, И. О. Мазунин, Т. Н. Малишевская [и др.] // Офтальмология. – 2019. – Т. 16, № 4. – С. 479–486.

31. Олейников, Д. А. Энергетический обмен миокарда в норме и при патологии / Д. А. Олейников, А. В. Яшин // Российский ветеринарный журнал. – 2015. – № 5. – С. 38.

32. Оценка иммуногенетических особенностей донорской крови / Ф. Н. Гильмиярова, Е. А. Шахнович, Н. С. Нефедова [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. – № 9. – С. 42.

33. Предсказание спектров биологической активности органических соединений с помощью веб-ресурса pass online / Д. А. Филимонов, А. А. Лагунин, Т. А. Глоризова [и др.] // Химия гетероциклических соединений. – 2014. – № 3. – С. 483–499.

34. Приказ № 2 от 9 января 1998 года. Об утверждении инструкций по иммуносерологии / Министерство здравоохранения Российской Федерации. – Текст : электронный // Техэксперт. Электронный фонд [сайт]. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/901705270> (дата обращения: 10.09.2020).

35. 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.

36. Проявления митохондриальной дисфункции у детей с дисплазией соединительной ткани и хроническим гастродуоденитом / И. И. Иванова, С. Ф. Гнусаев, В. С. Сухоруков [и др.] // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2019. – Т. 64, № 5. – С. 84–90.

37. Редкие варианты митохондриальной ДНК у ребенка с энцефаломиопатией / А. С. Воронкова, Н. А. Литвинова, Е. А. Николаева [и др.] // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2016. – Т. 61, № 5. – С. 42–46.

38. Роль индивидуальных особенностей митохондриальной ДНК в патогенезе болезни паркинсона / В. С. Сухоруков, А. С. Воронкова, Н. А. Литвинова [и др.] // Генетика. – 2020. – Т. 56, № 4. – С. 392–400.

39. Роль лактата в межмолекулярной регуляции взаимодействия белковых структур / Ф. Н. Гильмиярова, Н. А. Колотьева, В. И. Потехина [и др.] // Медицинский альманах. – 2017. – № 2(47). – С. 99–101.

40. Сафонова, О. А. Некоторые кинетические параметры и регуляторные свойства НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы из кардиомиоцитов крысы в норме и при ишемии / О. А. Сафонова, Т. Н. Попова, Л. В. Матасова // Вестник ВГУ. Химия. Биология. Фармация. – 2004. – № 1. – С. 142–146.

41. Северин, С. Е. Практикум по биохимии / С. Е. Северин, Г. А. Соловьева. – 2-е изд. – Москва : Изд-во МГУ, 1989. – 509 с.

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

43. Случай синдрома Ли, вызванный экспрессией мутации митохондриальной ДНК / С. И. Жаданов, Е. Я. Гречанина, Ю. Б. Гречанина [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2008. – Т. 108, № 5. – С. 80–83.

44. Состояние антиоксидантной системы в митохондриях клеток кожи при росте экспериментальной меланомы В16/F10 на фоне хронической нейрогенной боли / Е. М. Франциянц, И. В. Нескубина, Е. И. Сурикова [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2020. – Т. 19, № 2. – С. 96–103.

45. Сравнительное определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ и ресазурина / Л. В. Аникина, С. А. Пухов, Е. С. Дубровская [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 12. – С. 1423–1427.

46. Структурно-регуляторный потенциал лактата / Ф. Н. Гильмиярова, Н. А. Колотьева, Е. А. Рыскина [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 2. – С. 79.

47. Тканевые особенности полиморфизмов митохондриальной ДНК / Н. А. Литвинова, А. С. Воронкова, Е. А. Николаева [и др.] // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2015. – Т. 60, № 5. – С. 76–78.

48. Филимонов, Д. А. Прогноз спектра биологической активности органических соединений / Д. А. Филимонов, В. В. Поройков // Российский химический журнал им. Д. И. Менделеева. – 2006. – Т. 50, № 2. – С. 66–75.

49. Франциянц, Е. М. Митохондрии трансформированной клетки как мишень противоопухолевого воздействия / Е. М. Франциянц, И. В. Нескубина, Е. А. Шейко // Исследования и практика в медицине. – 2020. – Т. 7, № 2. – С. 92–108.

50. Шендеров, Б. А. Роль митохондрий в профилактической, восстановительной и спортивной медицине / Б. А. Шендеров // Вестник восстановительной медицины. – 2018. – № 1(83). – С. 21–31.

51. Ярцев, В. Н. Парадоксальное действие ацидоза на нейрогенный тонус кровеносных сосудов в условиях низкой температуры / В. Н. Ярцев // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2014. – № 4. – С. 84–85.

52. A Map of Protein-Metabolite Interactions Reveals Principles of Chemical Communication / I. Piazza, K. Kochanowski, V. Cappelletti [et al.] // Cell. – 2018. – Jan. 11, Vol. 172(1-2). – P. 358.e23–372.e23.

53. A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, Drosophila, and humans / D. K. Bricker, Eric B. Taylor, John C. Schell [et al.] // Science. – 2012. – Jul. 6, Vol. 337(6090). – P. 96–100.

54. A novel KDM5A/MPC-1 signaling pathway promotes pancreatic cancer progression via redirecting mitochondrial pyruvate metabolism / J. Cui, M. Quan, D. Xie [et al.] // Oncogene. – 2020. – Jan., Vol. 39(5). – P. 1140–1151.

55. A novel KLF4/LDHA signaling pathway regulates aerobic glycolysis in and progression of pancreatic cancer / M. Shi, J. Cui, J. Du [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2014. – Vol. 20. – P. 4370–4380.

56. A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles / S. A. Wagner, P. Beli, B. T. Weinert [et al.] // Mol. Cell. Proteomics. – 2011. – Vol. 10. – P. 111.

57. A systematic screen for protein–lipid interactions in *Saccharomyces cerevisiae* / O. Gallego, M. J. Betts, J. Gvozdenovic-Jeremic [et al.] // Mol. Syst. Biol. – 2010. – Vol. 6. – P. 430.

58. A whole-cell computational model predicts phenotype from genotype / J. R. Karr, J. C. Sanghvi, D. N. Macklin [et al.] // *Cell*. – 2012. – Jul. 20, Vol. 150(2). – P. 389–401.

59. Abbrescia, D. I. Malate-aspartate shuttle and exogenous NADH/cytochrome c electron transport pathway as two independent cytosolic reducing equivalent transfer systems / D. I. Abbrescia, G. La Piana, N. E. Lofrumento // *Arch Biochem. Biophys.* – 2012. – Feb. 15, Vol. 518(2). – P. 157–163.

60. ABO-blood groups system and morbidity / I. A. Selezneva, F. N. Gylmiyarova, O. A. Gusiakova [et al.] // *European Journal of Natural History*. – 2017. – Vol. 1. – P. 14–21.

61. Addition of sodium pyruvate to stored red blood cells attenuates liver injury in a murine transfusion model / S. Xia, G. Chen, B. Wang [et al.]. – Text : electronic // *Mediat. Inflamm.* – 2016. – Article ID 3549207. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2016/3549207/> (date of access: 09.03.2020).

62. The effect of pyruvate on antibody interaction with group-specific erythrocyte antigens / F. N. Gylmiyarova, V. M. Radomskaya, O. A. Gysyakova [et al.] // *Biomedical chemistry*. – 2014. – Vol. 8, № 3. – P. 260–266.

63. Allen, D. G. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms / D. G. Allen, G. D. Lamb, H. Westerblad // *Physiol. Rev.* – 2008. – Vol. 88(1). – P. 287–332.

64. Alterations of the glucose metabolism in a triose phosphate isomerase-negative *Saccharomyces cerevisiae* mutant / C. Compagno, L. Brambilla, D. Capitanio [et al.] // *Yeast*. – 2001. – Vol. 18(7). – P. 663–670.

65. Mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, *Drosophila*, and humans / D. K. Bricker, E. B. Taylor, J. C. Schell [et al.] // *Science*. – 2012. – Jul. 6, Vol. 337(6090). – P. 96–100.

66. An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis / K. Birsoy, T. Wang, W. W. Chen [et al.] // *Cell*. 2015. – Vol. 162(3). – P. 540–551.

67. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods / K. Saliminejad, H. Khorram Khorshid, S. Soleymani Fard [et al.] // *Journal of Cellular Physiology*. – 2018. – Vol. 234(5). – P. 5451–5465.
68. Analytical investigation: assay of D-lactate in diabetic plasma and urine / J. P. Talasniemi, S. Pennanen, H. Savolainen [et al.] // *Clin. Biochem.* – 2008. – Vol. 41(13). – P. 1099–1103.
69. Angelbello, A. J. Small molecule targeting of RNA structures in neurological disorders / A. J. Angelbello, J. L. Chen, M. D. Disney // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2020. – Jul., Vol. 1471(1). – P. 57–71.
70. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced by cadmium in cortical neurons in culture / E. Lopez, S. Figueroa, M. J. Oset-Gasque [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 138. – P. 901–911.
71. Arabidopsis thaliana AtGppl and AtGpp2: two novel low molecular weight phosphatases involved in plant glycerol metabolism / A. Caparros-Martin, S. Reiland, K. Kochert [et al.] // *Plant. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 63. – P. 505–517.
72. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation / A. Suzuki, S. A. Stern, O. Bozdagi [et al.] // *Cell*. – 2011. – Vol. 144. – P. 810–823.
73. Attwood, P. V. Decarboxylation of oxaloacetate by pyruvate carboxylase. / P. V. Attwood, W. W. Cleland // *Biochemistry*. – 1986. – Vol. 25. – P. 8191–8196.
74. Ballard, F. J. Changes in lipid synthesis in rat liver during development / F. J. Ballard, R. W. Hanson // *Biochem. J.* – 1967. – Vol. 102. – P. 952–958.
75. Blood Groups A and AB Are Associated With Increased Gastric Cancer Risk: Evidence From a Large Genetic Study and Systematic Review / Y. Mao, W. Yang, Q. Qi [et al.] // *BMC cancer*. – 2019. – Vol. 19(1). – P. 164.
76. Blood levels of glutamate oxaloacetate transaminase are more strongly associated with good outcome in acute ischaemic stroke than glutamate pyruvate

transaminase levels / F. Campos, M. Rodriguez-Yanez, M. Castellanos [et al.] // Clin. Sci. (Lond). – 2011. – Vol. 121. – P. 11–17.

77. Bracey, M. H. Structural commonalities among integral membrane enzymes / M. H. Bracey, B. F. Cravatt, R. C. Stevens // FEBS Lett. – 2004. – Vol. 567. – P. 159–165.

78. Breast cancer cells rely on environmental pyruvate to shape the metastatic niche / I. Elia, M. Rossi, S. Stegen [et al.] // Nature. – 2019. – April, Vol. 568(7750). – P. 117–121.

79. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth / R. J. Deberardinis, N. Sayed, D. Ditsworth [et al.] // Curr. Opin. Genet. Dev. – 2008. – Vol. 18. – P. 54–61.

80. Brooks, G. A. Bioenergetics of exercising humans / G. A. Brooks // Compr. Physiol. – 2012. – Jan., Vol. 2(1). – P. 537–562.

81. Brooks, G. A. Cell–cell and intracellular lactate shuttles / G. A. Brooks // J. Physiol. – 2009. – Vol. 587(23). – P. 5591–5600.

82. Brooks, G. A. Energy flux, lactate shuttling, mitochondrial dynamics, and hypoxia / G. A. Brooks // Adv. Exp. Med. Biol. – 2016. – Vol. 903. – P. 439–455.

83. Brooks, G. A. Intra- and extra-cellular lactate shuttles / G. A. Brooks // Med. Sci Sports Exerc. – 2000. – Vol. 32(4). – P. 790–799.

84. Brooks, G. A. Lactate shuttles in nature / G. A. Brooks // Biochem. Soc. Trans. – 2002. – Vol. 30(2). – P. 258–264.

85. Brooks, G. A. Lactate: Glycolytic end-product and oxidative substrate during sustained exercise in mammals—the “Lactate Shuttle” / G. A. Brooks // Circulation, respiration, and metabolism: current comparative approaches / ed. R. Gilles. – Springer, 1985. – P. 208–218.

86. Brooks, G. A. Lactate: link between glycolytic and oxidative metabolism / G. A. Brooks // Sports Med. – 2007. – Vol. 37(4–5). – P. 341–343.

87. Brooks, G. A. The metabolic systems: anaerobic metabolism (glycolytic and phosphagen) / G. A. Brooks, L. B. Gladden // Exercise physiology people and

ideas. – 2003. – P. 322–360.

88. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects / J. P. Bonnefont, F. Djouadi, C. Prip-Buus [et al.] // *Mol. Aspects Med.* – 2004. – Vol. 25. – P. 495–520.

89. Carrer, A. Metabolism and epigenetics: a link cancer cells exploit / A. Carrer, K. E. Wellen // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 34C. – P. 23–29.

90. Cate, A. R. A relationship between alkaline phosphatase activity and the phagocytosis and degradation of collagen by the fibroblast / A. R. Cate, S. Syrbu // *J. Anat.* – 1974. – Vol. 117(2). – P. 351–359.

91. Cell-state-specific metabolic dependency in hematopoiesis and leukemogenesis / Y. H. Wang, W. J. Israelsen, D. Lee [et al.] // *Cell.* – 2014. – Vol. 158. – P. 1309–1323.

92. Characterization of the human glycerol kinase promoter: identification of a functional HNF-4alpha binding site and evidence for transcriptional activation / S. V. Stepanian, S. T. Huyn, E. R. McCabe [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2003. – Vol. 80. – P. 412–418.

93. Chaturvedi, R. K. Mitochondrial diseases of the brain / R. K. Chaturvedi, M. F. Beal // *Free Radic. Biol. Med.* – 2013. – Vol. 63. – P. 1–29.

94. Chavez-Perez, V. A. Metabolic utilization of exogenous pyruvate by mutant p53 (R175H) human melanoma cells promotes survival under glucose depletion / V. A. Chavez-Perez, M. Strasberg-Rieber, M. Rieber // *Cancer Biol. Ther.* – 2011. – Oct. 1, Vol. 12(7). – P. 647–656.

95. Chemical screening methods to identify ligands that promote protein stability, protein crystallization, and structure determination / M. Vedadi, Frank H. Niesen, Abdellah Allali-Hassani [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Oct. 24, Vol. 103(43). – P. 15835–15840.

96. Chen, C. M. Development of an enzymatic assay system of d-lactate using d-lactate dehydrogenase and a UV-LED fluorescent spectrometer / S. M. Chen, P. J. Chien, H. Y. Yu // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2015. – Vol. 116. – P. 150–155.

97. Chen, S. Small-Molecule Immuno-Oncology Therapy: Advances, Challenges and New Directions / S. Chen, Z. Song, A. Zhang // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2019. – Vol. 19(3). – P. 180–185.

98. Chowdhury, S. K. High activity of mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase and glycerophosphate-dependent ROS production in prostate cancer cell lines, *Biochem* / S. K. Chowdhury, A. Gemin, G. Singh // *Biophys. Res. Commun.* – 2005. – Vol. 333. – P. 1139–1145.

99. Cid, E. Amino acid substitutions at sugar-recognizing codons confer ABO blood group system-related α 1,3 Gal(NAc) transferases with differential enzymatic activity / E. Cid, M. Yamamoto, F. Yamamoto // *Sci. Rep.* – 2019. – Jan. 29, Vol. 9(1). – P. 846.

100. Citrin/mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase double knock-out mice recapitulate features of human citrin deficiency / T. Saheki, M. Iijima, M. X. Li [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282. – P. 25041–25052.

101. Closing the anion gap: contribution of D-lactate to diabetic ketoacidosis / J. Lu, G. A. Zello, E. Randell [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2011. – Vol. 412(3–4). – P. 286–291.

102. C-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth / H. Shim, C. Dolde, B. C. Lewis [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – Vol. 94. – P. 6658–6663.

103. Cole, E. S. Isolation and characterization of flavin-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase from rabbit skeletal muscle mitochondria and comparison with the enzyme from rabbit brain / E. S. Cole, C. A. Lepp, P. D. Holohan, T. P. Fondy // *J. Biol. Chem.* – 1978. – Vol. 253. – P. 7952–7959.

104. Collagen Degradation in Aged/Photodamaged Skin In Vivo and After Exposure to Matrix Metalloproteinase-1 In Vitro / S. E. Fligiel, J. Varani, S. C. Datta [et al.] // *Journal of Investigative Dermatology.* – 2003. – Vol. 120(5). – P. 842–848.

105. Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity / M. I. Davis, J. P. Hunt, S. Herrgard [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 29. – P. 1046–1051.
106. Comprehensive review on lactate metabolism in human health / M. Adeva-Andany, M. López-Ojén, R. Funcasta-Calderón [et al.] // *Mitochondrion.* – 2014. – Vol. 17C. – P. 76–100.
107. Conformational changes on substrate binding revealed by structures of methylobacterium extorquens malate dehydrogenase / J. M. Gonzalez, Ricardo Marti-Arbona, Julian C. H. Chen [et al.] // *Acta Crystallogr. F Struct Biol. Commun.* – 2018. – Oct. 1, Vol. 74(Pt 10). – P. 610–616.
108. Contributions of astrocytes to synapse formation and maturation – potential functions of the perisynaptic extracellular matrix / A. Faissner, M. Pyka, M. Geissler [et al.] // *Brain Res. Rev.* – 2010. – Vol. 63. – P. 26–38.
109. Coordination of microbial metabolism / V. Chubukov, L. Gerosa, K. Kochanowski [et al.] // *Nature Reviews Microbiology.* – 2014. – Vol. 12(5). – P. 327–340.
110. Crabtree, H. G. The carbohydrate metabolism of certain pathological overgrowths / H. G. Crabtree // *Biochem.* – 1928. – Vol. 22. – P. 1289–1298.
111. Crystal structures of human glycerol 3-phosphate dehydrogenase 1 (GPD1) / Xianjin Ou, Chaoneng Ji, Xueqing Han [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 357(3). – P. 858–869.
112. Dasika, S. K. Determination of the catalytic mechanism for mitochondrial malate dehydrogenase / S. K. Dasika, K. C. Vinnakota, D. A. Beard // *Biophysical Journal.* – 2015. – Jan., Vol. 108. – P. 408–419.
113. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG / M. Kanehisa, S. Goto, Y. Sato [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – Vol. 42. – P. D199–D205.
114. Deepshikha Mishra. Lactate Dehydrogenases as Metabolic Links between Tumor and Stroma in the Tumor Microenvironment / Deepshikha Mishra,

Debabrata Banerjee // *Cancers (Basel)*. – 2019. – May 29, Vol. 11(6). – pii: E750.

115. Deme, D. Prognostic importance of lactate dehydrogenase (LDH) in oncology / D. Deme, A. Telekes // *Orv. Hetil.* – 2017. – Dec., Vol. 158(50). – P. 1977–1988.

116. Denton, R. M. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions / R. M. Denton // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2009. – Vol. 1787. – P. 1309–1316.

117. Determining the conformational stability of a protein from urea and thermal unfolding curves / G. R. Grimsley, S. R. Trevino, R. L. Thurlkill [et al.] // *Curr. Protoc. Protein Sci.* – 2013. – Vol. 71(1). – P. 28.4.1–28.4.14.

118. Dewan, J. G. Coenzyme-linked reactions between dehydrogenase systems / J. G. Dewan, D. E. Green // *Biochem.* – 1937. – Vol. 31. – P. 1074–1085.

119. Dimauro, S. Mitochondrial encephalomyopathies – fifty years on: the Robert Wartenberg Lecture / S. Dimauro // *Neurology*. – 2013. – Vol. 81. – P. 281–291.

120. Discovery of a glycerol 3-phosphate phosphatase reveals glycerophospholipid polar head recycling in *Mycobacterium tuberculosis* / G. Larrouy-Maumus, T. Biswas, D. M. Hunt [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2013. – Vol. 110. – P. 11320–11325.

121. D-lactic acidosis secondary to short bowel syndrome / D. L. Zhang, Z. W. Jiang, J. Jiang [et al.] // *Postgrad. Med. J.* – 2003. – Vol. 79(928). – P. 110–112.

122. Dolin, M. I. Kinetics of malic-lactic transhydrogenase. Effect of the keto-enol tautomerism of oxalacetate on the kinetics of oxalacetate formation and utilization / M. I. Dolin // *J. Biol. Chem.* – 1968. – Jul. 25, Vol. 243(14). – P. 3916–3923.

123. DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism / V. Law, C. Knox, Y. Djoumbou [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – Vol. 42. – P. D1091–D1097.

124. Effect of exercise on mouse liver and brain bioenergetic infrastructures / E. Lezi, Jianghua Lu, Jeffrey M. Burns [et al.] // *Exp. Physiol.* – 2013. – Jan., Vol. 98(1). – P. 207–219.
125. Emerging new strategies for successful metabolite identification in metabolomics / K. Bingol, L. Bruschiweiler-Li, D. Li [et al.] // *Bioanalysis.* – 2016. – Mar., Vol. 8(6). – P. 557–573.
126. Endogenous 2-oxoacids differentially regulate expression of oxygen sensors / C. L. Dalgard, H. Lu, A. Mohyeldin [et al.] // *Biochem. J.* – 2004. – Vol. 380(Pt2). – P. 419–424.
127. Endurance training increases gluconeogenesis during rest and exercise in men / B. C. Bergman, M. A. Horning, G. A. Casazza [et al.] // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2000. – Vol. 278(2). – P. 244–251.
128. Enzymatic synthesis of citrate from pyruvate and oxalacetate / S. Korke, J. R. Stern, I. C. Gunsalić [et al.] // *Nature.* – 1950. – Vol. 166. – P. 439–440.
129. Ethyl pyruvate alleviates radiation-induced lung injury in mice / B. Chen, F. Na, H. Yang [et al.] // *Biomed. Pharmacother.* – 2017. – Aug., Vol. 92. – P. 468–478.
130. Ethyl Pyruvate Directly Attenuates Active Secretion of HMGB1 in Proximal Tubular Cells via Induction of Heme Oxygenase-1 / M. S. Seo, H. J. Kim, H. Kim [et al.] // *J. Clin. Med.* – 2019. – May 8, Vol. 8(5). – pii: E629.
131. Ethyl pyruvate suppresses the growth, invasion and migration and induces the apoptosis of non-small cell lung cancer cells via the HMGB1/RAGE axis and the NF- κ B/STAT3 pathway / Q. Liu, Y. Huo, H. Zheng [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2019. – Aug., Vol. 42(2). – P. 817–825.
132. Evaluation of Human Cerebrospinal Fluid Malate Dehydrogenase 1 as a Marker in Genetic Prion Disease Patients / I. Zerr, A. Villar-Piqué, Vanda Edit Schmitz [et al.]. – Text : electronic // *Biomolecules.* – 2019. – Nov. 28, Vol. 9(12).

– 800. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31795176/> (date of access: 09.03.2020).

133. Evidence for a compensated thermogenic defect in transgenic mice lacking the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene / R. A. DosSantos, A. Alfadda, K. Eto [et al.] // *Endocrinology*. – 2003. – Vol. 144. – P. 5469–5479.

134. Evidence for the pro-oxidant effect of g-glutamyltranspeptidase-related enzyme / M. Enoiu, H. Aberkane, J. F. Salazar [et al.] // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2000. – Nov. 1, Vol. 29(9). – P. 825–833.

135. Exequiel T. Pineda, J. R. Ligand binding and protein dynamics in lactate dehydrogenase / J. R. Exequiel T. Pineda, Robert Callender, Steven D. Schwartz // *Biophys. J.* – 2007. – Sep. 1, Vol. 93(5). – P. 1474–1483.

136. Exercise inducible lactate dehydrogenase B regulates mitochondrial function in skeletal muscle / X. Liang, L. Liu, T. Fu [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2016. – Vol. 291(49). – P. 25306–25318.

137. Exon-centric regulation of pyruvate kinase M alternative splicing via mutually exclusive exons / Z. Wang, D. Chatterjee, H. Y. Jeon [et al.] // *J. Mol. Cell. Biol.* – 2012. – Vol. 4. – P. 79–87.

138. Expression profiling in progressive stages of fumarate-hydratase deficiency: the contribution of metabolic changes to tumorigenesis / H. Ashrafian, L. O’Flaherty, J. Adam [et al.] // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 70. – P. 9153–9165.

139. Extensive in vivo metabolite–protein interactions revealed by large-scale systematic analyses / X. Li, T. A. Gianoulis, K. Y. Yip [et al.] // *Cell*. – 2010. – Vol. 143. – P. 639–650.

140. Fantin, V. R. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance / V. R. Fantin, Julie St-Pierre, Philip Leder // *Cancer Cell*. – 2006. – Jun., Vol. 9(6). – P. 425–434.

141. FAT SIGNALS elipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling / R. Zechner, R. Zimmermann, T. O. Eichmann [et al.] // *Cell. Metab.* – 2012. – Vol.

15. – P. 279–291.

142. Filipp, F. V. Cancer metabolism meets systems biology: Pyruvate kinase isoform PKM2 is a metabolic master regulator / F. V. Filipp // *Journal of Carcinogenesis*. – 2013. – Vol. 12. – P. 14.

143. Finisterer, J. Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults / J. Finisterer // *Pediatr. Neurol.* – 2008. – Vol. 39(4). – P. 223–235.

144. Flaxman, H. A. Mapping the small molecule interactome by mass spectrometry / H. A. Flaxman, C. M. Woo // *Biochemistry*. – 2018. – Jan. 16, Vol. 57(2). – P. 186–193.

145. Fondy, T. P. Structural studies on rabbit muscle glycerol 3-phosphate dehydrogenase and a comparison of chemical and physical determinations of its molecular weight / T. P. Fondy, C. R. Ross, S. J. Sollohub // *J. Biol. Chem.* – 1969. – Vol. 244. – P. 1631–1644.

146. FOXM1 promotes the Warburg effect and pancreatic cancer progression via transactivation of LDHA expression / J. Cui, M. Shi, D. Xie [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2014. – Vol. 20. – P. 2595–2606.

147. Gamma-glutamyltransferase of Cancer Cells at the Crossroads of Tumor Progression, Drug Resistance and Drug Targeting / A. Corti, M. Franzini, A. Paolicchi [et al.] // *Anticancer research*. – 2010. – Vol. 30. – P. 1169–1182.

148. Garrib, A. Purification and characterization of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (flavin-linked) from rat liver mitochondria / A. Garrib, W. C. McMurray // *J. Biol. Chem.* – 1986. – Vol. 261. – P. 8042–8048.

149. Gerosa, L. Regulation and control of metabolic fluxes in microbes / L. Gerosa, U. Sauer // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 22. – P. 566–575.

150. Gladden, L. B. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium / L. B. Gladden // *The Journal of Physiology*. – 2004. – Vol. 558(Pt 1). – P. 5–30.

151. Global analysis of protein activities using proteome chips / H. Zhu, M. Bilgin, R. Bangham [et al.] // *Science*. – 2001. – Vol. 293. – P. 2101–2105.

152. Glucose contribution to in vivo synthesis of glyceride glycerol and fatty acids in rats adapted to a high protein, carbohydrate free diet / L. M. Botion, M. N. Brito, N. A. Brito [et al.] // *Metabolism*. – 1998. – Vol. 47. – P. 1217–1221.

153. Glutaric acidemia type II: gene structure and mutations of the electron transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductase (ETF:QO) gene / S. I. Goodman, R. J. Binard, M. R. Wootner [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2002. – Vol. 77. – P. 86–90.

154. Glycerol phosphate shuttle enzyme GPD2 regulates macrophage inflammatory responses / P. K. Langston, A. Nambu, J. Jung [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2019. – Sep., Vol. 20(9). – P. 1186–1195.

155. Glycerol production from glucose and fructose by 3T3-L1 cells: a mechanism of adipocyte defense from excess substrate / Maria del Mar Romero, David Sabater, Jose Antonio Fernandez–Lopez [et al.]. – Text : electronic // *PLoS One*. – 2015. – Oct. 1. – e0139502. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0139502> (date of access: 09.03.2020).

156. Glycerol-3-phosphatase of *Corynebacterium glutamicum* / S. N. Lindner, T. M. Meiswinkel, M. Panhorst [et al.] // *J. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 159. – P. 216–224.

157. Glycolysis-respiration relationships in a neuroblastoma cell line / R. H. Swerdlow, E. Lezi, D. Aires [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1830. – P. 2891–2898.

158. Goward, C. R. Malate dehydrogenase: A model for structure, evolution, and catalysis / C. R. Goward, D. J. Nicholls // *Protein Science*. – 1994. – Vol. 3(10). – P. 1883–1888.

159. GPD1 Specifically Marks Dormant Glioma Stem Cells with a Distinct Metabolic Profile / P. Rusu, C. Shao, A. Neuberburg [et al.] // *Cell. Stem. Cell.* – 2019. – Aug. 1, Vol. 25(2). – P. 241–257.

160. Gray, L. R. Regulation of pyruvate metabolism and human disease / L. R. Gray, S. C. Tompkins, E. B. Taylor // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2014. – Jul., Vol. 71(14). – P. 2577–2604.
161. Green, D. E. Alpha-Glycerophosphate dehydrogenase / D. E. Green // *Biochem. J.* – 1936. – Vol. 30. – P. 629–644.
162. Halestrap, A. P. Monocarboxylic acid transport / A. P. Halestrap // *Compr. Physiol.* – 2013. – Vol. 3. – P. 1611–1643.
163. Halestrap, A. P. The monocarboxylate transporter family—role and regulation / A. P. Halestrap, M. C. Wilson // *IUBMB Life.* – 2012. – Vol. 64(2). – P. 101–109.
164. Halestrap, A. P. The monocarboxylate transporter family—structure and functional characterization / A. P. Halestrap // *IUBMB Life.* – 2012. – Vol. 64(1). – P. 1–9.
165. Halestrap, A. P. The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond / A. P. Halestrap D. Meredith // *Pflgers Archiv.* – 2004. – Vol. 447(5). – P. 619–628.
166. Halophilic adaptation: novel solvent protein interactions observed in the 2.9 and 2.6 Å resolution structures of the wild type and a mutant of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui* / S. B. Richard, D. Madern, E. Garcin [et al.] // *Biochemistry.* – 2000. – Vol. 39. – P. 992–1000.
167. Haploinsufficiency of the GPD2 gene in a patient with nonsyndromic mental retardation / H. Daoud, N. Gruchy, J. M. Constans [et al.] // *Hum. Genet.* – 2009. – Vol. 124. – P. 649–658.
168. Heinemann, M. Systems biology of microbial metabolism / M. Heinemann, U. Sauer // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2010. – Vol. 13. – P. 343–337.
169. Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes / R. J. Perry, J.-P. G. Camporez, R. Kursawe [et al.] // *Cell.* – 2015. – Vol. 160. – P. 745–758.

170. Hepatic glycerol metabolism is early reprogrammed in rat liver cancer development / F. Lorenzetti, A. M. Capiglioni, R. A. Marinelli [et al.] // *Biochimie.* – 2020. – Mar., Vol. 170. – P. 88–93.

171. Her, Y. F. Succinate Dehydrogenase Loss in Familial Paraganglioma: Biochemistry, Geneics, and Epigenetics / Y. F. Her, L. J. Masher // *International Journal of Endocrinology.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 296167.

172. High blood glutamate oxaloacetate transaminase levels are associated with good functional outcome in acute ischemic stroke / F. Campos, T. Sobrino, P. Ramos-Cabrer [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2011. – Vol. 31. – P. 1387–1393.

173. High efficiency of ROS production by glycerophosphate dehydrogenase in mammalian mitochondria / T. Mracek, A. Pecinova, M. Vrbacky [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2009. – Vol. 481. – P. 30–36.

174. High expression of thyroid hormone receptors and mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in the liver is linked to enhanced fatty acid oxidation in Lou/C, a rat strain resistant to obesity / N. Taleux, B. Guigas, H. Dubouchaud [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284. – P. 4308–4316.

175. Higher lactate and purine metabolite levels in erythrocyte-rich fresh venous thrombus: Potential markers for early deep vein thrombosis / K. Maekawa, C. Sugita, A. Yamashita [et al.] // *Thromb. Res.* – 2019. – May, Vol. 177. – P. 136–144.

176. Homeostasis of glutamate in brain fluids: an accelerated brain-to-blood efflux of excess glutamate is produced by blood glutamate scavenging and offers protection from neuropathologies / V. I. Teichberg, K. Cohen-Kashi-Malina, I. Cooper [et al.] // *Neuroscience.* – 2009. – Vol. 158. – P. 301–308.

177. Human Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase: X-Ray Crystal Structures that Guide the Interpretation of Mutagenesis Studies / L. S. Mydy, J. R. Cristobal, R. D. Katigbak [et al.] // *Biochemistry.* – 2019. – Vol. 58(8). – P. 1061–1073.

178. Human mitochondrial pyruvate carrier 2 as an autonomous membrane transporter / R. S. Nagampalli, J. E. Quesñay, D. Adamoski [et al.] // *Scientific Reports*. – 2013. – Vol. 8. – P. 3510.

179. Hyperpolarized (¹³C) magnetic resonance reveals early- and late-onset changes to in vivo pyruvate metabolism in the failing heart / M. A. Schroeder, A. Z. Lau, A. P. Chen [et al.] // *Eur. J. Heart Fail.* – 2013. – Vol. 15. – P. 130–140.

180. Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier / E. Raemy, S. Montessui, J. L. Veuthey [et al.] // *Science*. – 2012. – Vol. 337. – P. 93–96.

181. Identification of a mammalian glycerol-3-phosphate phosphatase: role in metabolism and signaling in pancreatic beta-cells and hepatocytes / Y. Mugabo, S. Zhao, A. Seifried [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2016. – Vol. 113. – P. 430–439.

182. Identification of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 as a tumour suppressor in human breast cancer / C. Zhou, J. Yu, M. Wang [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Sep. 19, Vol. 8(60). – P. 101309–101324.

183. Identification of putative c-Myc-responsive genes: characterization of rcl, a novel growth-related gene / B. C. Lewis, H. Shim, Q. Li [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 1997. – Vol. 17. – P. 4967–4978.

184. Impaired mitochondrial pyruvate importation in a patient and a fetus at risk / M. Brivet, A. Garcia-Cazorla, S. Lyonnet [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2003. – Mar., Vol. 78(3). – P. 186–192.

185. In silico Discovery of Enzyme–Substrate Specificity-determining Residue Clusters / G.-X. Yu, B.-H. Park, P. Chandramohan [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. – 2005. – Vol. 352(5). – P. 1105–1117.

186. Inactivation of UCP1 and the Glycerol Phosphate Cycle Synergistically Increases Energy Expenditure to Resist Diet-induced Obesity / L. J. Brown, R. A. Koza, C. Everett [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 32892–32898.

187. Increased expression of mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase and antioxidant enzymes in prostate cancer cell lines/cancer / S. K. Chowdhury, S. Raha, M. A. Tarnopolsky [et al.] // *Free Radic. Res.* – 2007. – Vol. 41. – P. 1116–1124.

188. Increased glyceroneogenesis in adipose tissue from rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet: role of dietary fatty acids / S. C. Brito, W. L. Festuccia, N. H. Kawashita [et al.] // *Metabolism.* – 2006. – Vol. 55. – P. 84–89.

189. Influence of AB0 Blood Group and Rhesus Factor on Breast Cancer Risk: A Meta-Analysis of 9665 Breast Cancer Patients and 244,768 Controls / S. Y. Miao, W. Zhou, L. Chen [et al.] // *Asia-Pacific journal of clinical oncology.* – 2014. – Vol. 10(2). – P. 101–108.

190. Inhibition of Glyceroneogenesis by Histone Deacetylase 3 Contributes to Lipodystrophy in Mice with Adipose Tissue Inflammation / J. Zhang, T. M. Henagan, Z. Gao [et al.] // *Endocrinology.* – 2011. – Vol. 152. – P. 1829.

191. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression / A. Le, C. R. Cooper, A. M. Gouw [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2010. – Vol. 107(5). – P. 2037–2042.

192. Inhibition of LDH-A by oxamate induces G2/M arrest, apoptosis and increases radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells / X. Zhai, Y. Yang, J. Wan [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2013. – Vol. 30. – P. 2983–2991.

193. Inhibition of the interaction between the SARS-CoV spike protein and its cellular receptor by anti-histo-blood group antibodies / P. Guillon, M. Clément, V. Sébille [et al.] // *Glycobiology.* – 2008. – Dec., Vol. 18(12). – P. 1085–1093.

194. Intermolecular interaction of proteins and small molecules (review) / E. A. Ryskina, N. A. Kolotyeva, F. N. Gilmiyarova [et al.] // *European Journal of Natural History.* – 2016. – Vol. 3. – P. 8–13.

195. Intracoronary pyruvate in cardiogenic shock as an adjunctive therapy to catecholamines and intra-aortic balloon pump shows beneficial effects on

hemodynamics / W. Schillinger, M. Hünlich, S. Sossalla [et al.] // *Clin. Res. Cardiol.* – 2011. – Vol. 100(5). – P. 433–438.

196. Isoform-specific alanine aminotransferase measurement can distinguish hepatic from extrahepatic injury in humans / I. Rafter, T. Graberg, A. Kotronen [et al.] // *Int. J. Mol. Med.* – 2012. – Vol. 30(5). – P. 1241–1249.

197. Jin, L. Targeting protein–protein interaction by small molecules / L. Jin, W. Wang, G. Fang // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2014. – Vol. 54. – P. 435–456.

198. Johnson, A. C. M. Pyruvate Acute kidney injury Injury-induced depletion / A. C. M. Johnson, R. A. Zager // *Nephron. Clin. Pract.* – 2014. – Vol. 127. – P. 129–132.

199. Jones, R. S. Monocarboxylate Transporters: Therapeutic targets and prognostic factors in disease / R. S. Jones, M. E. Morris // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2016. – Vol. 100(5). – P. 454–463.

200. Jonkman, J. Any way you slice it—a comparison of confocal microscopy techniques / J. Jonkman, C. M. Brown // *J. Biomol. Tech.* – 2015. – Jul., Vol. 26(2). – P. 54–65.

201. Jorgensen, W. L. The many roles of computation in drug discovery / W. L. Jorgensen // *Science.* – 2004. – Vol. 303(5665). – P. 1813–1818.

202. Jovanovic, S. M-LDH serves as a regulatory subunit of the cytosolic substrate-channelling complex in vivo / S. Jovanovic, A. Jovanovic, R. M. Crawford // *J. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 371. – P. 349–361.

203. Kaelin, W. G. Jr. Influence of metabolism on epigenetics and disease / W. G. Jr. Kaelin, S. L. McKnight // *Cell.* – 2013. – Mar. 28, Vol. 153(1). – P. 56–69.

204. Kalluri, R. The biology and function of fibroblasts in cancer / R. Kalluri // *Nat. Rev. Cancer.* – 2016. – Aug. 23, Vol. 16(9). – P. 582–598.

205. Karsy, M. Prognostic role of mitochondrial pyruvate carrier in isocitrate dehydrogenase-mutant glioma / M. Karsy, J. Guan, L. E. Huang // *J. Neurosurg.* –

2018. – Mar. 16, Vol. 130(1). – P. 56–66.

206. Kather, H. Adipose tissue and obesity / H. Kather // *Ther Umsch.* – 2000. – Vol. 57(8). – P. 488–492.

207. Kazuhito, A. Some *Lactobacillus*-Lactate Dehydrogenases Exhibit Comparable Catalytic Activities for Pyruvate and Oxaloacetate / A. Kazuhito, T. Kamata, H. Uchikoba, S. Fushinobu [et al.] // *Journal of bacteriology* – 2001. – 183 (1) - p. 397–400

208. Kim, J. W. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect / J. W. Kim, C. V. Dang // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66. – P. 8927–8930.

209. Klevecz, R. R. Cyclic changes in enzyme activity in synchronized mammalian cell cultures / R. R. Klevecz, F. H. Ruddle // *Science.* – 1968. – Vol. 159. – P. 634–636.

210. Knockdown of malic enzyme 2 suppresses lung tumor growth, induces differentiation and impacts PI3K/AKT signaling / J. G. Ren, P. Seth, C. B. Clish [et al.] // *Sci. Rep.* – 2014. – Vol. 4. – P. 5414.

211. Koopman, W. J. Monogenic mitochondrial disorders / W. J. Koopman, P. H. Willems, J. A. Smeitink // *N. Engl. J. Med.* – 2012. – Vol. 366. – P. 1132–1141.

212. Kota, V. Tyrosine phosphoproteome of hamster spermatozoa: role of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 in sperm capacitation / V. Kota, V. M. Dhople, S. Shivaji // *Proteomics.* – 2009. – Vol. 9. – P. 1809–1826.

213. Krebs, H. A. The Pasteur effect and the relations between respiration and fermentation / H. A. Krebs // *Essays Biochem.* – 1972. – Vol. 8. – P. 1–34.

214. Kroemer, G. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel / G. Kroemer, J. Pouyssegur // *Cancer Cell.* – 2008. – Vol. 13. – P. 472–482.

215. Kubista, V. Accumulation of a stable phosphorus compound in glycolysing insect muscle / V. Kubista // *Nature.* – 1957. – Vol. 180. – P. 549.

216. Lactate administration reproduces specific brain and liver exercise-related changes / E. Lezi, Jianghua Lu, J. Eva Selfridge [et al.] // *J. Neurochem.* –

2013. – Oct., Vol. 127(1). – P. 91–100.

217. Lactate as a Metabolite and a Regulator in the Central Nervous System / P. Proia, C. M. Di Liegro, G. Schiera [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – Sep. 1, Vol. 17(9). – pii: E1450.

218. Lactate Deficit in an Alzheimer Disease Mouse Model: The Relationship With Neuronal Damage / M. Zhang, X. Cheng, R. Dang [et al.] // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 2018. – Dec. 1, Vol. 77(12). – P. 1163–1176.

219. Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81 / C. Liu, J. Wu, J. Zhu [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284(5). – P. 2811–2822.

220. Lactate is always the end product of glycolysis / M. J. Rogatzki, B. S. Ferguson, M. L. Goodwin [et al.] // *Front Neurosci.* – 2015. – Vol. 9. – P. 22.

221. Lactate receptor sites link neurotransmission, neurovascular coupling, and brain energy metabolism / K. H. Lauritzen, C. Morland, M. Puchades [et al.] // *Cereb. Cortex.* – 2014. – Vol. 24(10). – P. 2784–2795.

222. Lactate, Not Pyruvate, Is the End Product of Glucose Metabolism via Glycolysis / A. Schurr, M. Caliskan, H. I. Kavakli [et al.] // *Biochem. Genet. Mol. Biol. In Tech, Rijeka.* – 2017. – P. 2.

223. Lactate-mediated glia-neuronal signalling in the mammalian brain / F. Tang, S. Lane, A. Korsak [et al.] // *Nat. Commun.* – 2014. – Vol. 5. – P. 3284.

224. Lactic Acid Upregulates VEGF Expression in Macrophages and Facilitates Choroidal Neovascularization / J. Song, K. Lee, S. W. Park [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2018. – Jul. 2, Vol. 59(8). – P. 3747–3754.

225. Lasseter, B. F. *Biochemistry in the Lab: A Manual for Undergraduates* / B. F. Lasseter. – Boca Raton : CRC Press, 2019. – 188 p.

226. LDH-A inhibition, a therapeutic strategy for treatment of hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer / H. Xie, V. A. Valera, M. J. Merino [et al.] // *Mol. Cancer Ther.* – 2009. – Vol. 8. – P. 626–635.

227. Lee, L. A. C-Myc transrepression and cell transformation / L. A. Lee, C. V. Dang // *Curr. Top Microbiol. Immunol.* – 1997. – Vol. 224. – P. 131–135.
228. Levy, B. Lactate and shock state: the metabolic view / B. Levy // *Curr. Opin. Crit. Care.* – 2006. – Vol. 12(4). – P. 315–321.
229. Li Shanshan. Systematic mapping of protein-metabolite interactions with mass spectrometry-based techniques / Li Shanshan, Wenqing Shui // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2020. – Aug., Vol. 64. – P. 24–31.
230. Li, X. Systematic investigation of protein-small molecule interactions / X. Li, X. Wang, M. Snyder // *IUBMB Life.* – 2013. – Vol. 65(1). – P. 2–8.
231. Linked cycles of oxidative decarboxylation of glyoxylate as protometabolic analogs of the citric acid cycle / G. Springsteen, J. R. Yerabolu, J. Nelson [et al.] // *Nat. Commun.* – 2018. – Vol. 9(1). – P. 91.
232. Lipinski, C. Navigating chemical space for biology and medicine / C. Lipinski, A. Hopkins // *Nature.* – 2004. – Vol. 432. – P. 855–861.
233. Luzarowski, M. Emerging strategies for the identification of protein-metabolite interactions / M. Luzarowski, A. Skirycz // *J. Exp. Bot.* – 2019. – Sep. 24, Vol. 70(18). – P. 4605–4618.
234. Mack, G. W. The body fluid and hemopoietic systems / G. W. Mack // *ACSM's advanced exercise physiology* / eds P. A. Farrell, M. J. Joyner, V. J. Caiozzo. – 2nd ed. – New York : Lippincott Williams & Wilkins, 2012. – P. 535–536.
235. Mackay, N. Measurement of the ratio of lactate to pyruvate in skin fibroblast cultures / N. Mackay, B. H. Robinson // *Methods in cell biology.* – 2007. – Vol. 80. – P. 173–178.
236. Magistretti, P. J. Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging / P. J. Magistretti, L. Pellerin // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* – 1999. – Vol. 354. – P. 1155–1163.
237. Malate and Fumarate Extend Lifespan in *Caenorhabditis elegans* / C. B. Edwards, N. Copes, A. G. Brito [et al.] // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8(3). –

e58345.

238. Malate dehydrogenase of the cytosol. A kinetic investigation of the reaction mechanism and a comparison with lactate dehydrogenase / A. Lodola, J. D. Shore, D. M. Parker [et al.] // *Biochem J.* – 1978. – Dec. 1, Vol. 175(3). – P. 987–998.

239. Malate dehydrogenase: distribution, function and properties / R. A. Musrati, M. Kollárová, N. Mernik [et al.] // *Gen. Physiol. Biophys.* – 1998. – Vol. 17(3). – P. 193–210.

240. Malate Dehydrogenases - Structure and Function Gen / P. Minárik, N. Tomáková, M. Kollárová [et al.] // *Physiol. Biophys.* – 2002. – Vol. 21. – P. 257–265.

241. Malate-aspartate shuttle mediates the intracellular ATP levels, antioxidation capacity and survival of differentiated PC12 cells / C. Wang, H. Chen, J. Zhang [et al.] // *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology.* – 2014. – Vol. 6(2). – P. 109–114.

242. Malate-aspartate shuttle promotes l-lactate oxidation in mitochondria / O. Altinok, J. L. Poggio, D. E. Stein [et al.] // *J. Cell. Physiol.* – 2020. – Mar., Vol. 235(3). – P. 2569–2581.

243. Mallet, R. T. Pyruvate enhancement of cardiac performance: Cellular mechanisms and clinical application / R. T. Mallet, A. H. Olivencia-Yurvati, R. Bünger // *Exp. Biol. Med. (Maywood).* – 2018. – Jan., Vol. 243(2). – P. 198–210.

244. Marche, S. Comparative study of *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma brucei* NAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase / S. Marche, P. A. Michels, F. R. Opperdoes // *Mol. Biochem. Parasitol.* – 2000. – Vol. 106. – P. 83–91.

245. Maret, W. Enzyme regulation by reversible zinc inhibition: glycerol phosphate dehydrogenase as an example / W. Maret, C. A. Yetman, L. Jiang // *Chem. Biol. Interact.* – 2001. – Jan. 30, Vol. 130–132(1–3). – P. 891–901.

246. Markert, C. L. Evolution of a gene. Multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation / C. L. Markert, J. B. Shaklee, G. S. Whitt // *Science*. – 1975. – Vol. 189. – P. 102–114.

247. Marsh, W. L. Scoring of hemagglutination reactions / W. L. Marsh // *Transfusion*. – 1972. – Vol. 12(5). – P. 352–353.

248. Martin L., Schwarz S., Breitsprecher D. Analyzing Thermal Unfolding of Proteins: The Prometheus NT.48. Application Note NT-PR-001. NanoTemper Technologies GmbH. – 2014. – p. 1-8.

249. Mazelis, M. Carbon Dioxide Fixation into Oxalacetate in Higher Plants / M. Mazelis, B. Vennesland // *Plant Physiology*. – 1957. – Vol. 32(6). – P. 591–600.

250. McArdle disease: what do neurologists need to know? / A. Lucia, G. Nogales-Gadea, M. Perez [et al.] // *Nat. Clin. Pract. Neurol.* – 2008. – Vol. 4. – P. 568–577.

251. McCommis, K. S. Mitochondrial pyruvate transport: a historical perspective and future research directions / K. S. McCommis, B. N. Finck // *Biochem J.* – 2015. – Vol. 466(3). – P. 443–454.

252. MDH1 and MPP7 Regulate Autophagy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma / M. New, T. Van Acker, J. I. Sakamaki [et al.] // *Cancer Res.* – 2019. – Apr. 15, Vol. 79(8). – P. 1884–1898.

253. ME1 Regulates NADPH Homeostasis to Promote Gastric Cancer Growth and Metastasis / Y. X. Lu, H. Q. Ju, Z. X. Liu [et al.] // *Cancer Res.* – 2018. – Apr. 15, Vol. 78(8). – P. 1972–1985.

254. Mechanisms of amino acid-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* / J. Canfield, N. Copes, A. Brito [et al.] // *BMC Genomics*. – 2015. – Vol. 16(1). – P. 8.

255. Metabolic analysis of senescent human fibroblasts reveals a role for AMP in cellular senescence / W. Zwerschke, S. Mazurek, P. Stöckl [et al.] //

Biochemical Journal. – 2003. – Vol. 376(2). – P. 403–411.

256. Metabolic control of signaling pathways and metabolic auto-regulation / D. Lorendeau, S. Christen, G. Rinaldi [et al.] // *Biol. Cell.* – 2015. – Vol. 107. – P. 251–272.

257. Metabolic engineering of lactate dehydrogenase rescues mice from acidosis / A. P. Acharya, M. Rafi, E. C. Woods [et al.] // *Sci. Rep.* – 2014. – Vol. 4. – P. 5189.

258. Metabolic profiling of breast cancer: Differences in central metabolism between subtypes of breast cancer cell lines / L. Willmann, M. Schlimpert, S. Halbach [et al.] // *Journal of Chromatography B.* – 2015. – Sept. 1, Vol. 1000. – P. 95–104.

259. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation / D. Zhang, Z. Tang, H. Huang [et al.] // *Nature.* – 2019. – Oct., Vol. 574(7779). – P. 575–580.

260. Metabolomic analysis reveals hepatic metabolite perturbations in citrin/mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase double-knockout mice, a model of human citrin deficiency / T. Saheki, K. Inoue, H. Ono [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2011. – Vol. 104. – P. 492–500.

261. Mice with deletion of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene exhibit a thrifty phenotype: effect of gender / A. Alfadda, R. A. DosSantos, Z. Stepanyan [et al.] // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2004. – Vol. 287. – P. 147–156.

262. Microscale Thermophoresis as a Sensitive Method to Quantify Protein: Nucleic Acid Interactions in Solution / K. Zillner, M. Jerabek-Willemsen, S. Duhr [et al.] // *Meth. Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 815. – P. 241–252.

263. Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions / S. A. Seidel, P. M. Dijkman, W. A. Lea [et al.] // *Methods.* – 2013. – Vol. 59(2013). – P. 301–315.

264. Mitochondria and the Brain: Bioenergetics and Beyond / P. Belenguer, J. M. N. Duarte, P. F. Schuck [et al.] // *Neurotox. Res.* – 2019. – Aug., Vol. 36(2). – P. 219–238.

265. Mitochondrial complex I deficiency: from organelle dysfunction to clinical disease / F. Distelmaier, W. J. Koopman, L. P. van den Heuvel [et al.] // *Brain.* – 2009. – Vol. 132. – P. 833–842.

266. Mitochondrial DNA methylation as a next-generation biomarker and diagnostic tool / V. Iacobazzi, A. Castegna, V. Infantino [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2013. – Sep.-Oct., Vol. 110(1-2). – P. 25–34.

267. Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination / C. Yan, X. Duanmu, L. Zeng [et al.] // *Cells.* – 2019. – Apr. 25, Vol. 8(4). – P. 379.

268. Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype / C. D. Wiley, M. C. Velarde, P. Lecot [et al.] // *Cell. Metabolism.* – 2016. – Vol. 23(2). – P. 303–314.

269. Mitochondrial metabolism: a common link between neuroinflammation and neurodegeneration / Debapriya Garabadu, Nidhi Agrawal, Anjali Sharma [et al.] // *Behav. Pharmacol.* – 2019. – Dec., Vol. 30(8). – P. 642–652.

270. Mitochondrial pyruvate import and its effects on homeostasis / B. Vanderperre, T. Bender, E. R. Kunji [et al.] // *Curr. Opin. Cell. Biol.* – 2014. – Vol. 33. – P. 35–41.

271. Mitochondrial reticulum for cellular energy distribution in muscle / L. M. Hartnell, D. Malide, Z. X. Yu [et al.] // *Nature.* – 2015. – Vol. 523(7562). – P. 617–620.

272. Moffatt, B. A. Purine and Pyrimidine Nucleotide Synthesis and Metabolism / B. A. Moffatt, H. Ashihara. – Text : electronic // *The Arabidopsis Book* / American Society of Plant Biologists. – 2002. – Apr. 4. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3243375/> (date of access: 09.03.2020).

273. Molecular characterization of 82 patients with pyruvate dehydrogenase complex deficiency. Structural implications of novel amino acid substitutions in E1 protein / A. Imbard, A. Boutron, C. Vequaud [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2011. – Dec., Vol. 104(4). – P. 507–516.

274. Molecular Insights into DC-SIGN Binding to Self-Antigens: The Interaction with the Blood Group A/B Antigens / P. Valverde, S. Delgado, J. D. Martínez [et al.] // *ACS Chem. Biol.* – 2019. – Jul. 19, Vol. 14(7). – P. 1660–1671.

275. Molecular interaction studies using microscale thermophoresis assay drug develop / M. Jerabek-Willemsen, C. J. Wienken, D. Braun [et al.] // *Technol.* – 2011. – Vol. 9(2011). – P. 342–353.

276. Monocarboxylate transporter 4 (MCT4) and CD147 overexpression is associated with poor prognosis in prostate cancer / N. Pertega-Gomes, J. R. Vizcain, V. Mirand-Goncalves [et al.] // *BMC Cancer.* – 2011. – Jul. 25, Vol. 11. – P. 312.

277. More on Association between ABO blood groups and risk of SARS-CoV-2 pneumonia / J. M. O'Sullivan, S. Ward, H. Fogarty [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2020. – Jul., Vol. 190(1). – P. 27–28.

278. MPC1 and MPC2 expressions are associated with favorable clinical outcomes in prostate cancer / Xiaoli Li, Yasai Ji, Gaoyang Han [et al.] // *BMC Cancer.* – 2016. – Nov. 16, Vol. 16(1). – P. 894.

279. MPST but not CSE is the primary regulator of hydrogen sulfide production and function in the coronary artery / M. M. Kuo, D. H. Kim, S. Jandu [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2016. – Jan. 1, Vol. 310(1). – P. H71–H79.

280. Mracek, T. The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues / T. Mráček, Z. Drahot, J. Houštek // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2013. – Vol. 27(3). – P. 401–410.

281. Muller, F. L. High rates of superoxide production in skeletal-muscle mitochondria respiring on both complex I-and complex II-linked substrates / F. L.

Muller, Y. Liu, M. A. Abdul-Ghani // *Biochem. J.* – 2008. – Vol. 409(2). – P. 491–499.

282. Mutations in MDH2, Encoding a Krebs Cycle Enzyme, Cause Early-Onset Severe Encephalopathy / S. Ait-El-Mkadem, M. Dayem-Quere, M. Gusic [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2017. – Jan. 5, Vol. 100(1). – P. 151–159.

283. Myatt, L. Oxidative stress in the placenta / L. Myatt, X. Cui // *Histochem. Cell. Biol.* – 2004. – Vol. 122. – P. 369–382.

284. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease / G. D. Lopaschuk, J. R. Ussher, C. D. L. Folmes [et al.] // *Physiol. Rev.* – 2010. – Vol. 90(1). – P. 207–258.

285. Nanoparticle-Assisted Metabolomics / B. Zhang, M. Xie, L. Bruschiweiler-Li [et al.] // *Metabolites.* – 2018. – Mar. 13, Vol. 8(1). – P. 21.

286. NARP-MILS syndrome caused by 8993 T>G mitochondrial DNA mutation: a clinical, genetic and neuropathological study / A. Rojo, Y. Campos, J. M. Sanchez [et al.] // *Acta Neuropathol.* – 2006. – Vol. 111. – P. 610–616.

287. Neel H. Shah. Understanding molecular mechanisms in cell signaling through natural and artificial sequence variation / Neel H. Shah, John Kuriyan // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2019. – Jan., Vol. 26(1). – P. 25–34.

288. Nelson, D. L. Lehninger principles of biochemistry / D. L. Nelson, M. M. Cox, A. L. Lehninger. – New York : W.H. Freeman, 2013.

289. Neuropathology of mitochondrial diseases / M. Filosto, G. Tomelleri, P. Tonin [et al.] // *Biosci. Rep.* – 2007. – Vol. 27. – P. 23–30.

290. Neuroprotection by glutamate oxaloacetate transaminase in ischemic stroke: an experimental study / F. Campos, T. Sobrino, P. Ramos-Cabrera [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2011. – Vol. 31. – P. 1378–1386.

291. New treatments for mitochondrial disease – no time to drop our standards / G. Pfeffer, R. Horvath, T. Klopstock [et al.] // *Nat. Rev. Neurol.* – 2013. – Vol. 9. – P. 474–481.

292. Nissanka, N. Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease / N. Nissanka, C. T. Moraes // *FEBS Lett.* – 2018. – Mar., Vol. 592(5). – P. 728–742.

293. Nonhepatic glucose production in humans / A. Battezzati, A. Caumo, A. Martino [et al.] // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2004. – Vol. 286(1). – P. 129–135.

294. 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.

295. Novel microscale approaches for easy, rapid determination of protein stability in academic and commercial settings / C. G. Alexander, R. Wanner, C. M. Johnson [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2014. – Vol. 1844 (2014). – P. 2241–2250.

296. Novel Mutations in the PC Gene in Patients with Type B Pyruvate Carboxylase Deficiency / E. Ostergaard, M. Duno, L. B. Møller [et al.] // *JIMD Rep.* – 2013. – Vol. 9. – P. 1–5.

297. Nutrient-sensitive mitochondrial NAD⁺ levels dictate cell survival / H. Yang, T. Yang, J. A. Baur [et al.] // *Cell.* – 2007. – Vol. 130. – P. 1095–1107.

298. Ogston, A. G. Interpretation of Experiments on Metabolic processes, using Isotopic Tracer Elements / A. G. Ogston // *Nature.* – 1948. – Vol. 162. – P. 963.

299. Ohkawa, K. I. Unusually high mitochondrial alpha glycerophosphate dehydrogenase activity in rat brown adipose tissue / K. I. Ohkawa, M. T. Vogt, E. Farber // *J. Cell. Biol.* – 1969. – Vol. 41. – P. 441–449.

300. Overexpression of the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in skeletal muscle repatterns energy metabolism in the mouse / P. Hakimi, J. Yang, G. Casadesus [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282. – P. 32844–32855.

301. Oxaloacetate activates brain mitochondrial biogenesis, enhances the insulin pathway, reduces inflammation and stimulates neurogenesis / H. M. Wilkins, J. L. Harris, S. M. Carl [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2014. – Vol. 23(24). – P. 6528–6541.

302. Oxaloacetate decreases the infarct size and attenuates the reduction in evoked responses after photothrombotic focal ischemia in the rat cortex / D. Nagy, M. Marosi, Z. Kis [et al.] // *Cell. Mol. Neurobiol.* – 2009. – Vol. 29(6-7). – P. 827–835.

303. Oxaloacetate enhances neuronal cell bioenergetic fluxes and infrastructure / H. M. Wilkins, S. Koppel, S. M. Carl [et al.] // *J. Neurochem.* – 2016. – Apr., Vol. 137(1). – P. 76–87.

304. Oxaloacetate supplementation increases lifespan in *Caenorhabditis elegans* through an AMPK/FOXO-dependent pathway / D. S. Williams, A. Cash, L. Hamadani [et al.] // *Aging Cell.* – 2009. – Vol. 8. – P. 765.

305. Oxaloacetate: A novel neuroprotective for acute ischemic stroke / F. Campos, T. Sobrino, P. Ramos-Cabrer [et al.] // *J. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* – 2012. – Vol. 44. – P. 262–265.

306. Oxaloacetic acid mediates ADP-dependent inhibition of mitochondrial complex II-driven respiration / B. D. Fink, F. Bai, L. Yu [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2018. – Dec. 21, Vol. 293(51). – P. 19932–19941.

307. Oxidation of alpha-ketoglutarate is required for reductive carboxylation in cancer cells with mitochondrial defects / A. R. Mullen, Z. Hu, X. Shi [et al.] // *Cell. Rep.* – 2014. – Vol. 7. – P. 1679–1690.

308. Oxidative stress biomarkers in mitochondrial myopathies, basally and after cysteine donor supplementation / M. Mancuso, D. Orsucci, A. Logerfo [et al.] // *J. Neurol.* – 2010. – Vol. 257(5). – P. 774–781.

309. Pardo, B. De novo Synthesis of Glial Glutamate and Glutamine in Young Mice Requires Aspartate Provided by the Neuronal Mitochondrial Aspartate-Glutamate Carrier Aralar/AGC1 / B. Pardo, L. Contreras, J. Satrústegui

// *Front Endocrinol (Lausanne)*. – 2013. – Vol. 4. – P. 149.

310. PASS Biological Activity Spectrum Predictions in the Enhanced Open NCI Database Browser / V. V. Poroikov, D. A. Filimonov, W. D. Ihlenfeldt [et al.] // *J. Chem. Inform. Comput. Sci.* – 2003. – Vol. 4(1). – P. 228–236.

311. Patterson, J. N. Mitochondrial metabolism of pyruvate is essential for regulating glucose-stimulated insulin secretion / J. N. Patterson, K. Cousteils, J. W. Lou [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289(19). – P. 13335–13346.

312. Pellerin, L. Ampakine CX546 bolsters energetic response of astrocytes: a novel target for cognitive-enhancing drugs acting as alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor modulators / L. Pellerin, P. J. Magistretti // *J. Neurochem.* – 2005. – Vol. 92(3). – P. 668–677.

313. Pellerin, L. Food for thought: challenging the dogmas / L. Pellerin, P. J. Magistretti // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2003. – Vol. 23. – P. 1282–1286.

314. Pellerin, L. Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons / L. Pellerin, P. J. Magistretti // *Neuroscientist*. – 2004. – Vol. 10. – P. 53–62.

315. Perea, G. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information / G. Perea, M. Navarrete, A. Araque // *Trends Neurosci.* – 2009. – Vol. 32. – P. 421–431.

316. Personal omics profiling reveals dynamic molecular and medical phenotypes / R. Chen, G. I. Mias, J. Li-Pook-Than [et al.] // *Cell*. – 2012. – Vol. 148. – P. 1293–1307.

317. Pesi, R. Metabolic interaction between urea cycle and citric acid cycle shunt: A guided approach / R. Pesi, F. Balestri, P. L. Ipata // *Biochem. Mol. Biol. Educ.* – 2018. – Mar., Vol. 46(2). – P. 182–185.

318. Phosphoglycerate mutase 1 coordinates glycolysis and biosynthesis to promote tumor growth / T. Hitosugi, L. Zhou, S. Elfe [et al.] // *Cancer Cell*. – 2012. – Vol. 22. – P. 585–600.

319. Photolabeling identifies an interaction between phosphatidylcholine and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (Gut2p) in yeast mitochondria / M. J. Janssen, F. van Voorst, G. E. Ploeger [et al.] // *Biochemistry*. – 2002. – Vol. 41. – P. 5702–5711.

320. Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation / G. Benard, G. Faustin, B. Passerieux [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2006. – Vol. 291. – P. 1172–1182.

321. Picard, M. The rise of mitochondria in medicine / M. Picard, D. C. Wallace, Y. Burelle // *Mitochondrion*. – 2016. – Sep., Vol. 30. – P. 105–116.

322. Possik, E. Glycerol-3-phosphate phosphatase/PGP: Role in intermediary metabolism and target for cardiometabolic diseases / E. Possik, S. R. Murthy Madiraju, Marc Prentki // *Biochimie*. – 2017. – Vol. 143. – P. 18–28.

323. Pregnancy complicated with lactate dehydrogenase M-subunit deficiency: the first case report / T. Anai, Kenichirou Urata, Yuichirou Tanaka [et al.] // *J. Obstet. Gynaecol. Res.* – 2002. – Apr., Vol. 28(2). – P. 108–111.

324. Pre-ischaemic mitochondrial substrate constraint by inhibition of malate-aspartate shuttle preserves mitochondrial function after ischaemia-reperfusion / N. R. Jespersen, T. Yokota, N. B. Støttrup [et al.] // *J. Physiol.* – 2017. – Vol. 595(12). – P. 3765–3780.

325. Prentki, M. Glycerolipid metabolism and signaling in health and disease / M. Prentki, S. R. Madiraju // *Endocr. Rev.* – 2008. – Vol. 29. – P. 647–676.

326. Prentki, M. Glycerolipid/free fatty acid cycle and islet beta-cell function in health, obesity and diabetes / M. Prentki, S. R. Madiraju // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2012. – Vol. 353. – P. 88–100.

327. Protection against intestinal injury from hemorrhagic shock by direct peritoneal resuscitation with pyruvate in rats / J. J. Zhang, Z. Z. Zhang, J. J. Ke [et al.] // *Shock*. – 2014. – Nov., Vol. 42(5). – P. 464–471.

328. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis / C. J. Wienken, P. Baaske, U. Rothbauer [et al.] // *Nat. Commun.* – 2010. – Oct. 19, Vol. 1. – P. 100.

329. Pyruvate antioxidant roles in human fibroblasts and embryonic stem cells / P. Ramos-Ibeas, M. Barandalla, S. Colleoni [et al.] // *Molecular and Cellular Biochemistry.* – 2017. – Vol. 429(1-2). – P. 137–150.

330. Pyruvate Carboxylation Enables Growth of SDH-Deficient Cells by Supporting Aspartate Biosynthesis / S. Cardaci, L. Zheng, G. MacKay [et al.] // *Nature cell biology.* – 2015. – Vol. 17.10. – P. 1317–1326.

331. Pyruvate dehydrogenase phosphatase 1 (PDP1) null mutation produces a lethal infantile phenotype / J. M. Cameron, M. Maj, V. Levandovskiy [et al.] // *Hum Genet.* – 2009. – Apr., Vol. 125(3). – P. 319–326.

332. Pyruvate dehydrogenase phosphatase deficiency: identification of the first mutation in two brothers and restoration of activity by protein complementation / Mary C Maj, Neviana MacKay, Valeriy Levandovskiy [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2005. – Jul., Vol. 90(7). – P. 4101-4107.

333. Pyruvate effects on red blood cells during in vitro cardiopulmonary bypass with dogs' blood / D. Gou, H. Tan, H. Cai [et al.] // *Artif. Organs.* – 2012. – Vol. 36(11). – P. 988–991.

334. Pyruvate enhances neurological recovery following cardiopulmonary arrest and resuscitation / A. B. Sharma, Matthew A. Barlow, Shao-Hua Yang [et al.] // *Resuscitation.* – 2008. – Jan., Vol. 76(1). – P. 108–119.

335. Pyruvate in oral rehydration salt improves hemodynamics, vasopermeability and survival after burns in dogs / R. Liu, X. H. Hu, S. M. Wang [et al.] // *Burns.* – 2016. – Vol. 42. – P. 797–806.

336. Pyruvate is a prospective alkalizer to correct hypoxic lactic acidosis / Y. Wang, Y. Huang, J. Yang [et al.] // *Mil. Med. Res.* – 2018. – Apr. 26, Vol. 5(1). – P. 13.

337. Pyruvate is superior to citrate in oral rehydration solution in the protection of intestine via hypoxia-inducible factor-1 activation in rats with burn injury / S. Hu, Z. L. Lin, Z. K. Zhao [et al.] // *J. Parenter. Enter. Nutr.* – 2016. – Vol. 40(7). – P. 924–933.

338. Pyruvate kinase isoform expression alters nucleotide synthesis to impact cell proliferation / S. Y. Lunt, V. Muralidhar, A. M. Hosios [et al.] // *Mol. Cell.* – 2015. – Vol. 57. – P. 95–107.

339. Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1 / W. Luo, H. Hu, R. Chang [et al.] // *Cell.* – 2011. – May 27. – Vol. 145(5). – P. 732–744.

340. Pyruvate kinase M2 regulates gene transcription by acting as a protein kinase / X. Gao, H. Wang, J. J. Yang [et al.] // *Mol. Cell.* – 2012. – Vol. 45. – P. 598–609.

341. Pyruvate Kinase M2 Regulates Hif-1alpha Activity and IL-1beta Induction and Is a Critical Determinant of the Warburg Effect in LPS-Activated Macrophages / E. M. Palsson-McDermott, A. M. Curtis, G. Goel [et al.] // *Cell. Metab.* – 2015. – Vol. 21. – P. 65–80.

342. Pyruvate modulates hepatic mitochondrial functions and reduces apoptosis indicators during hemorrhagic shock in rats / P. Sharma, K. T. Walsh, K. A. Kerr-Knott [et al.] // *Anesthesiology.* – 2005. – Vol. 103(1). – P. 65–73.

343. Pyruvate prevents poly-ADP ribose polymerase (PARP) activation, oxidative damage, and pyruvate dehydrogenase deactivation during hemorrhagic shock in swine / P. D. Mongan, J. Karaian, B. M. Van Der Schuur [et al.] // *J. Surg. Res.* – 2003. – Vol. 112(2). – P. 180–188.

344. Pyruvate Protects against Cellular Senescence through the Control of Mitochondrial and Lysosomal Function in Dermal Fibroblasts / J. Y. Kim, S. H. Lee, I. H. Bae [et al.] // *Journal of Investigative Dermatology.* – 2018. – Vol. 138(12). – P. 2522–2530.

345. Pyruvate Ringer's solution corrects lactic acidosis and prolongs survival during hemorrhagic shock in rats / S. Hu, X. D. Bai, X. Q. Liu [et al.] // *J. Emerg. Med.* – 2013. – Vol. 45(6). – P. 885–893.

346. Pyruvate treatment attenuates cerebral metabolic depression and neuronal loss after experimental traumatic brain injury / N. Moro, S. S. Ghavim, N. G. Harris [et al.] // *Brain Res.* – 2016. – Jul. 1, Vol. 1642. – P. 270–277.

347. Pyruvate-enriched cardioplegia suppresses cardiopulmonary bypass-induced myocardial inflammation / M. G. Ryou, D. C. Flaherty, B. Hoxha [et al.] // *Ann. Thorac. Surg.* – 2010. – Vol. 90. – P. 1529–1535.

348. Qiang, F. Effect of Malate-oligosaccharide Solution on Antioxidant Capacity of Endurance Athletes / F. Qiang // *The Open Biomedical Engineering Journal.* – 2015. – Oct. 19, Vol. 9. – P. 326–329.

349. Qifang, Xu ProtCID: a data resource for structural information on protein interactions / Xu Qifang, Roland L. Dunbrack Jr. // *Nat. Commun.* – 2020. – Feb. 5. – Vol. 11(1). – P. 711.

350. Qin, W. Chemoproteomic profiling of protein-metabolite interactions / W. Qin, F. Yang, C. Wang // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2020. – Feb., Vol. 54. – P. 28–36.

351. Rauckhorst, A. J. Mitochondrial pyruvate carrier function and cancer metabolism / A. J. Rauckhorst, E. B. Taylor // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2016. – Jun., Vol. 38. – P. 102–109.

352. Raymond, J. A. Two potential fish glycerol-3-phosphate phosphatases / J. A. Raymond // *Fish Physiol. Biochem.* – 2015. – Vol. 41. – P. 811–818.

353. Regulation of autophagy by cytosolic acetyl-coenzyme A / G. Marino, F. Pietrocola, T. Eisenberg [et al.] // *Mol. Cell.* – 2014. – Vol. 53. – P. 710–725.

354. Relationship between the ABO Blood Group and the COVID-19 Susceptibility / J. Zhao, Yan Yang, Hanping Huang [et al.]. – Text : electronic // *MedRxiv.* – 2020 – URL: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.11.20031096v2> (date of access: 09.03.2020).

355. Reshef, L. Effect of propionate on pyruvate metabolism in adipose tissue / L. Reshef, J. Niv, B. Shapiro // *J. Lipid Res.* – 1967. – Vol. 8. – P. 688–691.

356. Reszec, J. The expression of hypoxia-inducible factor-1 in primary brain tumors / J. Reszec, R. Rutkowski, L. Chyczewski // *Int. J. Neurosci.* – 2013. – Vol. 123. – P. 657–662.

357. Reversible inactivation of HIF-1 prolyl hydroxylases allows cell metabolism to control basal HIF-1 / H. Lu, C. L. Dalgard, A. Mohyeldin [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280. – P. 41928–41939.

358. Roberts, D. L. Biological mechanisms linking obesity and cancer risk: new perspectives / D. L. Roberts, C. Dive, A. G. Renehan // *Annu. Rev. Med.* – 2010. – Vol. 61. – P. 301–316.

359. Role of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 in mouse sperm capacitation / V. Kota, P. Rai, J. M. Weitzel [et al.] // *Mol. Reprod. Dev.* – 2010. – Vol. 77. – P. 773–783.

360. Role of malate dehydrogenase in facilitating lactate dehydrogenase to support the glycolysis pathway in tumors / S. Mansouri, A. Shahriari, H. Kalantar [et al.] // *Biomed. Rep.* – 2017. – Apr., Vol. 6(4). – P. 463–467.

361. Role of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 (PDHK4) in glucose homeostasis during starvation / N. H. Jeoung, P. Wu, M. A. Joshi [et al.] // *Biochem. J.* – 2006. – Vol. 397. – P. 417–425.

362. Role of the Malate-Aspartate Shuttle on the Metabolic Response to Myocardial Ischemia / M. Lu, L. Zhou, W. C. Stanley [et al.] // *Journal of Theoretical Biology.* – 2008. – Vol. 254(2). – P. 466–475.

363. Role of the Metabolic Minor Components in the Regulation of Intermolecular Interaction / F. N. Gilmiyarova, N. A. Kolotyeva, V. M. Radomskaya [et al.] // *Journal of Biosciences and Medicines.* – 2016. – Vol. 4. – P. 28–35.

364. ROS generation and multiple forms of mammalian mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase / T. Mráček, E. Holzerova, Z. Drahotka [et al.]

// *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2014. – Vol. 1837. – P. 98–111.

365. Rosenstein, P. G. Clinical use of plasma lactate concentration. Part 1: Physiology, pathophysiology, and measurement / P. G. Rosenstein, B. S. Tennent-Brown, D. Hughes // *J. Vet. Emerg. Crit. Care*. – 2018. – Vol. 28(2). – P. 85–105.

366. Rui, L. Energy Metabolism in the Liver / L. Rui // *Compr. Physiol.* – 2014. – Vol. 4. – P. 177–197.

367. Rutter, J. Succinate dehydrogenase – assembly, regulation and role in human disease / J. Rutter, D. R. Winge, J. D. Schiffman // *Mitochondrion*. – 2010. – Vol. 10. – P. 393–401.

368. Sandhu, C. Panomics for Precision Medicine / C. Sandhu, A. Qureshi, A. Emili // *Trends Mol. Med.* – 2018. – Vol. 24(1). – P. 85–101.

369. San-Millon, I. Reexamining cancer metabolism: Lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect / I. San-Millon, G. A. Brooks // *Carcinogenesis*. – 2017. – Vol. 38(2). – P. 119–133.

370. Schulze, J. Diabetes mellitus in the next decade / J. Schulze // *Z. Arztl. Fortbild. Qualitatssich.* – 2002. – Vol. 96(3). – P. 153.

371. Searle Ensembl / P. Flicek, I. Ahmed, M. R. Amode [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – Vol. 41. – P. 48–55.

372. Semenza, G. L. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level / G. L. Semenza // *Physiol.* – 2004. – Vol. 19(4). – P. 176–182.

373. Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2 / B. Chaneton, P. Hillmann, L. Zheng [et al.] // *Nature*. – 2012. – Vol. 491. – P. 458–462.

374. Serum lactic dehydrogenase strongly predicts survival in metastatic nasopharyngeal carcinoma treated with palliative chemotherapy / Y. Jin, X. Ye, L. Shao [et al.] // *Eur. J. Cancer*. – 2013. – Vol. 49. – P. 1619–1626.

375. Sharma, P. Hypertonic sodium pyruvate solution is more effective than Ringer's ethyl pyruvate in the treatment of hemorrhagic shock / P. Sharma, P. D. Mongan // *Shock*. – 2010. – May, Vol. 33(5). – P. 532–540.

376. Sharma, P. Mitochondrial DNA Integrity: Role in Health and Disease / P. Sharma, H. Sampath // *Cells*. – 2019. – Jan. 29, Vol. 8(2). – P. 100.
377. Siess, E. A. Concentration of free oxaloacetate in the mitochondrial compartment of isolated liver cells / E. A. Siess, R. I. Kientsch-Engel, O. H. Wieland // *Biochem. J.* – 1984. – Vol. 218(1). – P. 171–176.
378. Simultaneous quantification of protein-DNA contacts and transcriptomes in single cells / K. Rooijers, C. M. Markodimitraki, F. J. Rang [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2019. – Jul., Vol. 37(7). – P. 766–772.
379. Site-directed mutations in the FAD-binding domain of glycerophosphate dehydrogenase: catalytic defects with preserved mitochondrial anchoring of the enzyme in transfected COS-7 cells / M. Gudayol, M. E. Fabregat, J. Rasschaert [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2002. – Vol. 75. – P. 168–173.
380. Small molecule activation of PKM2 in cancer cells induces serine auxotrophy / C. Kung, J. Hixon, S. Choe [et al.] // *Chem. Biol.* – 2012. – Vol. 19. – P. 1187–1198.
381. Small-molecule modulation of p53 protein-protein interactions / A. Kuusk, H. Boyd, H. Chen [et al.] // *Biol. Chem.* – 2020. – Jul. 28, Vol. 401(8). – P. 921–931.
382. Snyder, M. Personal genome sequencing: current approaches and challenges / M. Snyder, J. Du, M. Gerstein // *Genes Dev.* – 2010. – Vol. 24. – P. 423–431.
383. Solier, S. Whole-genome mapping of small-molecule targets for cancer medicine / S. Solier, S. Müller, R. Rodriguez // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2020. – Jun., Vol. 56. – P. 42–50.
384. Sparkes, M. C. Glutamate pyruvate transaminase null allele in seven new families / M. C. Sparkes, M. Crist, R. S. Sparkes // *Hum Genet.* – 1983. – Vol. 65(2). – P. 147–148.

385. Specific properties of heavy fraction of mitochondria from human-term placenta –glycerophosphate-dependent hydrogen peroxide production / T. Honzik, Z. Drahota, M. Bohm [et al.] // *Placenta*. – 2006. – Vol. 27. – P. 348–356.

386. Steinbuchel, A. NAD-linked L(b)-lactate dehydrogenase from the strict aerobe *alcaligenes eutrophus*. 2. Kinetic properties and inhibition by oxaloacetate / A. Steinbuchel, H. G. Schlegel // *Eur. J. Biochem.* – 1983. – Vol. 130. – P. 329–334.

387. Stimulation of fibroblast proliferation by lactate-mediated oxidants / S. Wagner, M. Z. Hussain, T. K. Hunt [et al.] // *Wound Repair and Regeneration*. – 2004. – Vol. 12(3). – P. 368–373.

388. STITCH 2: an interaction network database for small molecules and proteins / M. Kuhn, D. Szklarczyk, A. Franceschini [et al.] // *Nucleic acids research*. – 2010. – Jan., Vol. 38(Database issue). – P. D552–D556.

389. STITCH 4: integration of protein–chemical interactions with user data / M. Kuhn, D. Szklarczyk, S. Pletscher-Frankild [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – Vol. 42. – P. D401–D407.

390. STITCH 5: augmenting protein–chemical interaction networks with tissue and affinity data / D. Szklarczyk, A. Santos, Christian von Mering [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2016. – Vol. 44. – P. D380–D384.

391. STITCH: interaction networks of chemicals and proteins / M. Kuhn, C. von Mering, M. Campillos [et al.] // *Nucleic acids research*. – 2008. – Jan., Vol. 36 (Database issue). – P. D684–D688.

392. Structural comparison between the open and closed forms of citrate synthase from *Thermus thermophilus* HB8 / S. Kawaguchi, S. Kurmitsu, T. Kouyama [et al.] // *Biophysics and Physicobiology*. – 2015. – Vol. 2. – P. 47–56.

393. Structural studies on Nicotinamide Adenine Dinucleotide-linked L-glycerol 3-phosphate dehydrogenase crystallized from Rat skeletal muscle / T. P. Fondy, L. Levin, S. J. Sollohub [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1968. – Vol. 243. – P. 3148–3160.

394. Structure of alpha-glycerophosphate oxidase from *Streptococcus* sp.: a template for the mitochondrial alpha-glycerophosphate dehydrogenase / T. Colussi, D. Parsonage, W. Boles [et al.] // *Biochemistry*. – 2008. – Vol. 47. – P. 965–977.

395. Structures of bacterial homologues of SWEET transporters in two distinct conformations / Y. Xu, Y. Tao, L. S. Cheung [et al.] // *Nature*. – 2014. – Vol. 515. – P. 448–452.

396. Structures of citrate synthase and malate dehydrogenase of *Mycobacterium tuberculosis* / D. M. Ferraris, R. Spallek, W. Oehlmann [et al.] // *Proteins*. – 2015. – Vol. 83. – P. 389–394.

397. Structures of lactate dehydrogenase A (LDHA) in apo, ternary and inhibitor-bound forms / S. Kolappan, D. L. Shen, R. Mosi [et al.] // *Acta Cryst.* – 2015. – Vol. D71. – P. 185–195.

398. Studying protein–protein interactions using peptide arrays / C. Katz, L. Levy-Beladev, S. Rotem-Bamberger [et al.] // *Chem. Soc. Rev.* – 2011. – Vol. 40. – P. 2131–2145.

399. Subramani, P. A. Molecular docking of Glyceroneogenesis pathway intermediates with Peroxisome Proliferator- Activated Receptor-Alpha (PPAR- α) / P. A. Subramani, K. Panati, V. R. Narala // *Bioinformation*. – 2013. – Vol. 9(12). – P. 629–632.

400. Succinate dehydrogenase subunit B (SDHB) gene deletion associated with a composite paraganglioma/neuroblastoma / R. Armstrong, K. L. Greenhalgh, E. Rattenberry [et al.] // *Med. Genet.* – 2009. – Vol. 46(3). – P. 215–216.

401. Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells / L. B. Sullivan, D. Y. Gui, A. M. Hosios [et al.] // *Cell*. – 2015. – Jul. 30, Vol. 162(3). – P. 552–563.

402. Swerdlow, R. H. Bioenergetic medicine / R. H. Swerdlow // *Br. J. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 171. – P. 1854–1869.

403. Swerdlow, R. H. Mitochondrial medicine and the neurodegenerative mitochondriopathies / R. H. Swerdlow // *Pharmaceuticals*. – 2009. – Vol. 2. – P.

150–167.

404. Swerdlow, R. H. Role and treatment of mitochondrial DNA-related mitochondrial dysfunction in sporadic neurodegenerative diseases / R. H. Swerdlow // *Curr. Pharm. Des.* – 2011. – Vol. 17. – P. 3356–3373.

405. Swerdlow, R. H. The neurodegenerative mitochondriopathies / R. H. Swerdlow // *J. Alzheimers Dis.* – 2009. – Vol. 17. – P. 737–751.

406. Targeting metabolism to induce cell death in cancer cells and cancer stem cells / C. Pecqueur, L. Oliver, K. Oizel [et al.]. – Text : electronic // *Int. J. Cell. Biol.* – 2013. – Vol. 2013. – 805975. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3583110/> (date of access: 09.03.2020).

407. Testis-specific expression of rat mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in haploid male germ cells / J. M. Weitzel, N. B. Shiryayeva, R. Middendorff [et al.] // *Biol. Reprod.* – 2003. – Vol. 68. – P. 699–707.

408. The beneficial metabolic effects of insulin sensitizers are not attenuated by mitochondrial pyruvate carrier 2 hypomorphism / P. A. Vigueira, K. S. McCommis, W. T. Hodges [et al.] // *Exp. Physiol.* – 2017. – Aug. 1, Vol. 102(8). – P. 985–999.

409. The Biochemical and Clinical Perspectives of Lactate Dehydrogenase: An Enzyme of Active Metabolism / A. A. Khan, K. S. Allemailem, F. A. Alhumaydhi [et al.] // *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets.* – 2020. – Vol. 20(6). – P. 855–868.

410. The BRAF Inhibitor Vemurafenib Activates Mitochondrial Metabolism and Inhibits Hyperpolarized Pyruvate-Lactate Exchange in BRAF-Mutant Human Melanoma Cells / T. Delgado-Goni, M. F. Miniotis, S. Wantuch [et al.] // *Mol. Cancer Ther.* – 2016. – Dec., Vol. 15(12). – P. 2987–2999.

411. The ChEMBL bioactivity database: an update / A. P. Bento, A. Gaulton, A. Hersey [et al.] // *Nucleic. Acids Res.* – 2014. – Vol. 42. – P. D1083–D1090.

412. The Comparative Toxicogenomics Database's 10th year anniversary: update 2015 / A. P. Davis, C. J. Grondin, K. Lennon-Hopkins [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – Vol. 43. – P. D914–D920.

413. The effect of pyruvate on the development and progression of post-stroke depression: A new therapeutic approach / D. Frank, R. Kuts, P. Tsenter [et al.] // *Neuropharmacology.* – 2019. – Sep. 1, Vol. 155. – P. 173–184.

414. The malate-aspartate NADH shuttle components are novel metabolic longevity regulators required for calorie restriction-mediated life span extension in yeast / E. Easlson, F. Tsang, C. Skinner [et al.] // *Genes Dev.* – 2008. – Vol. 22. – P. 931–944.

415. The metabolic demands of cancer cells are coupled to their size and protein synthesis rates / S. C. Dolfi, L. L. Chan, J. Qiu [et al.] // *Cancer Metab.* – 2013. – Vol. 1. – P. 20.

416. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases / R. Caspi, T. Altman, R. Billington [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – Vol. 42. – P. D459–D471.

417. The role of d-lactate in differential diagnosis of acute appendicitis / A. I. Filiz, H. Aladag, M. L. Akin [et al.] // *J. Invest. Surg.* – 2010. – Vol. 23(4). – P. 218–223.

418. The role of the mtDNA set point in differentiation, development and tumorigenesis / Xin Sun, Justin C. St. John // *Biochem. J.* – 2016. – Oct. 1, Vol. 473(19). – P. 2955–2971.

419. The self-inhibitory nature of metabolic networks and its alleviation through compartmentalization / M. T. Alam, V. Olin-Sandoval, A. Stincone [et al.] // *Nature Communications.* – 2017. – Vol. 8, Article number: 16018(2017).

420. The spectrum of pyruvate dehydrogenase complex deficiency: clinical, biochemical and genetic features in 371 patients / K. P. Patel, T. W. O'Brien, S. H. Subramony [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2012. – Jan., Vol. 105(1). – P. 34–43.

421. The Warburg effect: insights from the past decade / M. Upadhay, J. Samal, M. Kandpal [et al.] // *Pharmacol. Ther.* – 2013. – Vol. 137(3). – P. 318–330.

422. Time-course of hormonal induction of mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase biogenesis in rat liver / T. Mracek, P. Jesina, P. Krivakova [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2005. – Vol. 1726. – P. 217–223.

423. Tissue specific differences in mitochondrial DNA maintenance and expression / E. Herbers, N. J. Kekäläinen, A. Hangan [et al.] // *Mitochondrion.* – 2019. – Jan., Vol. 44. – P. 85–92.

424. Tolerability and pharmacokinetics of oxaloacetate 100 mg capsules in Alzheimer's subjects / R. H. Swerdlow, R. Bothwell, L. Hutfles [et al.] // *BBA Clinical.* – 2016. – Vol. 5. – P. 120–123.

425. Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase / J. Y. Jeong, N. H. Jeoung, K. G. Park [et al.] // *Diabetes Metab.* – 2012. – Vol. 36. – P. 328–335.

426. Tsukidate, T. Targeted and proteome-wide analysis of metabolite-protein interactions / T. Tsukidate, Q. Li, H. C. Hang // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2020. – Feb., Vol. 54. – P. 19–27.

427. Tumor-associated macrophage interleukin- β promotes glycerol-3-phosphate dehydrogenase activation, glycolysis and tumorigenesis in glioma cells / J. Lu, Z. Xu, H. Duan [et al.] // *Cancer Sci.* – 2020. – Jun., Vol. 111(6). – P. 1979–1990.

428. Utter, M. F. Pyruvate carboxylase. I. Nature of the reaction / M. F. Utter, D. B. Keech // *J. Biol. Chem.* – 1963. – Vol. 238. – P. 2603–2608.

429. Utter, M. F. Some properties of oxalacetic carboxylase / M. F. Utter, K. Kurahashi // *J. Biol. Chem.* – 1954. – Vol. 207(2). – P. 803–819.

430. Van Nostrand, E. L. Experimental and Computational Considerations in the Study of RNA-Binding Protein-RNA Interactions / E. L. Van Nostrand, S. C. Huelga, G. W. Yeo // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2016. – Vol. 907. – P. 1–28.

431. Van Waveren, C. Transcriptional co-expression and co-regulation of genes coding for components of the oxidative phosphorylation system / C. van Waveren, C. T. Moraes // *BMC Genomics*. – 2008. – Vol. 9. – P. 18.

432. Vander Heiden, M. G. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens / M. G. Vander Heiden // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2011. – Vol. 10. – P. 671–684.

433. Vander Heiden, M. G. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation / M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, C. B. Thompson // *Science*. – 2009. – Vol. 324. – P. 1029–1033.

434. Visualization of protein structures interaction / F. N. Gilmiyarova, N. A. Koloteva, V. I. Potekhina [et al.] // *European Journal of Natural History*. – 2017. – Vol. 5. – P. 3–6.

435. Wall, M. E. Design of gene circuits: lessons from bacteria / M. E. Wall, W. S. Hlavacek, M. A. Savageau // *Nature Rev. Genet.* – 2004. – Vol. 5. – P. 34–42.

436. Walsh, C. T. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications / C. T. Walsh, S. Garneau-Tsodikova, G. J. Gatto Jr. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2005. – Vol. 44. – P. 7342–7372.

437. Wang, C. S. Inhibition of human erythrocyte lactate dehydrogenase by high concentrations of pyruvate. Evidence for the competitive substrate inhibition / C. S. Wang // *Eur. J. Biochem.* – 1977. – Vol. 78. – P. 569–574.

438. Wang, W. Novel targets for mitochondrial medicine / W. Wang, G. Karamanlidis, R. Tian // *Sci Transl. Med.* – 2016. – Vol. 8. – P. 326.

439. Warburg, O. On respiratory impairment in cancer cells / O. Warburg // *Science*. – 1956. – Vol. 124. – P. 269–270.

440. Warburg, O. On the origin of cancer cells / O. Warburg // *Science*. – 1956. – Vol. 123. – P. 309–314.

441. Watmough, N. J. The electron transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductases / N. J. Watmough, F. E. Frerman // *Biochim. Biophys. Acta*. –

2010. – Vol. 1797. – P. 1910–1916.

442. Weck, K. E. Interpretation of genomic sequencing: variants should be considered uncertain until proven guilty / K. E. Weck // *Genet. Med.* – 2018. – Mar., Vol. 20(3). – P. 291–293.

443. Williamson, J. R. Inhibition of glycolysis by pyruvate in relation to the accumulation of citric acid cycle intermediates in the perfused rat heart / J. R. Williamson, E. A. Jones // *Nature.* – 1964. – Vol. 203. – P. 1171–1173.

444. Wood, H. G. The utilization of CO₂ by the propionic acid bacteria in the dissimilation of glycerol / H. G. Wood, C. H. Werkman // *Biochem. J.* – 1935. – Vol. 30. – P. 332.

445. Wroblewski, F. Lactic dehydrogenase activity in blood / F. Wroblewski, J. S. Ladue // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1955. – Vol. 90(1). – P. 210–213.

446. Yamamoto, H. A. Effect of alpha-ketoglutarate and oxaloacetate on brain mitochondrial DNA damage and seizures induced by kainic acid in mice / H. A. Yamamoto, P. V. Mohanan // *Toxicol Lett.* – 2003. – Vol. 143. – P. 115–122.

447. Yang, G. X. Investigating metabolite-protein interactions: an overview of available techniques / G. X. Yang, X. Li, M. Snyder // *Methods.* – 2012. – Aug., Vol. 57(4). – P. 459–466.

448. Yeh, J. I. Structure of glycerol-3-phosphate dehydrogenase, an essential monotopic membrane enzyme involved in respiration and metabolism / J. I. Yeh, U. Chinte, S. Du // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2008. – Vol. 105. – P. 3280–3285.

449. Zager, R. A. Renal cortical pyruvate depletion during AKI / R. A. Zager, A. C. Johnson, K. Becker // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2014. – May, Vol. 25(5). – P. 998–1012.

450. Zanella, A. Pyruvate kinase deficiency / A. Zanella, P. Bianchi, E. Fermo // *Haematologica.* – 2007. – Jun. – Vol. 92(6). – P. 721–723.

451. Zebe, E. C. Lactic and alpha-glycerophosphate dehydrogenases in insects / E. C. Zebe, W. H. McShan // *J. Gen. Physiol.* – 1957. – Vol. 40. – P. 779–790.

452. Zhang, J. Structure of electron transfer flavoproteinubiquinone oxidoreductase and electron transfer to the mitochondrial ubiquinone pool / J. Zhang, F. E. Frerman, J. J. Kim // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2006. – Vol. 103. – P. 16212–16217.

453. Zhao, Y. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics / Y. Zhao, E. B. Butler, M. Tan // *Cell. Death Dis.* – 2013. – Vol. 4. – P. 532.

ПРИЛОЖЕНИЯ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2698628

**СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ ВЛИЯНИЯ
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА КОНФОРМАЦИЮ БЕЛКА**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
"Самарский государственный медицинский университет"
Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2019118363

Приоритет изобретения 13 июня 2019 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 28 августа 2019 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 13 июня 2039 г.

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

 *Г.П. Ивлиев*



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2680408

**СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ ВЛИЯНИЯ
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА АФФИНИТЕТ БЕЛОК-
ЛИГАНДНОЙ СВЯЗИ**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
"Самарский государственный медицинский университет"
Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2018109670

Приоритет изобретения 19 марта 2018 г.

Дата государственной регистрации в

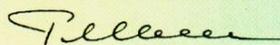
Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 21 февраля 2019 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 19 марта 2038 г.

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

 Г.П. Ивлиев



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2484480

**СПОСОБ ОЦЕНКИ ДЕЙСТВИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА АНТИГЕН-АНТИТЕЛЬНОЕ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ**

Патентообладатель(ли): *Шахнович Елена Александровна (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2012115145

Приоритет изобретения 16 апреля 2012 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре
изобретений Российской Федерации 10 июня 2013 г.

Срок действия патента истекает 16 апреля 2032 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Б.Л. Симонов