

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ имени
А.Н. БЕЛОЗЕРСКОГО

На правах рукописи

ШИНДЯПИНА АНАСТАСИЯ ВАЛЕРЬЕВНА

**МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КОНТРОЛЯ
ЭНДОГЕННОГО МЕТАНОЛА И ФОРМАЛЬДЕГИДА
У МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

03.01.03 – Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель: доктор
биологических наук, профессор,
Дорохов Юрий Леонидович

Москва – 2017

Оглавление

Список сокращений.....	4
Введение.....	5
1. Обзор литературы. Метаболизм эндогенного метанола и его регуляция.....	9
1.1. Источники метанола в организме млекопитающих.....	9
Экзогенные источники. Отравления метанолом.....	10
1.2. Источники эндогенного метанола и формальдегида.....	10
Деметилирование.....	11
Семикарбозид-чувствительные аминоксидазы.....	11
Микрофлора кишечника.....	11
Пектинметилэстераза (ПМЭ).....	12
Метанмонооксигеназа.....	13
Формальдегиддисмутаза.....	13
Диоксигеназа галловой кислоты.....	14
4-метилоксалоацетатэстераза.....	14
Метилэстераза глутамата белков.....	15
Фермент биосинтеза биотина BioH (BioH).....	16
1.3. Выведение коротких спиртов из организма млекопитающих.....	17
Физиологический клиренс.....	17
Метаболический клиренс: первая стадия окисления метанола и этанола.....	18
Алкогольдегидрогеназы.....	20
Цитохромоксидазы P450.....	22
Каталаза.....	24
1.4. Окисление коротких альдегидов в организме млекопитающих.....	27
Метаболизм одноуглеродных соединений при участии тетрагидрофолата.....	27
Алкогольдегидрогеназа III класса.....	29
Альдегиддегидрогеназа 2.....	31

Цитохроксидазы P450.....	32
1.5. Фармацевтические регуляторы метаболизма метанола.....	32
Ингибиторы первой фазы метаболизма метанола и этанола.....	32
Ингибиторы второй фазы метаболизма метанола и этанола.....	33
Alda-1, активатор альдегиддегидрогеназы 2.....	33
1.6. Участие этанола в регуляции экспрессии генов млекопитающих.....	34
Активация экспрессии CYP2E1.....	34
Активация воспалительного ответа в мозге.....	35
Влияние на экспрессию генов рецепторов нейротрансмиттеров.....	35
1.7. Патологические свойства формальдегида и метанола.....	36
1.8. Альфа-липоевая кислота как потенциальный регулятор метаболизма эндогенного метанола. .38	
Свойства АЛК как антиоксиданта.....	39
Влияние АЛК на сигнальные каскады клетки.....	41
Влияние АЛК на когнитивные способности пациентов с БА.....	42
2. Материалы и методы.....	43
2.1. Эксперименты с животными.....	43
Эксперименты с добровольцами.....	45
Подготовка образцов для хроматографии.....	46
Измерение концентрации спиртов методом газовой хроматографии.....	46
Измерение концентрации формальдегида методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).....	48
Выделение лейкоцитов.....	50
Выделение РНК.....	51
Анализ тотальной РНК из мозга мышей на микроматрицах.....	51
кОТ-ПЦР.....	52
Получение цитоплазматической и митохондриальной фракций белков мозга.....	54
Измерение активности альдегиддегидрогеназы 2.....	56

Измерение активности формальдегиддегидрогеназы.....	56
Измерение активности альдегиддегидрогеназы 2 (АлДГ2) в митохондриальном экстракте гомогенатов мозга мышей.....	58
Расчет активности ферментов.....	60
Измерение концентрации восстановленной формы глутатиона.....	60
3. Результаты.....	61
3.1. Роль растительной пектинметилэстеразы и пектина в генерации эндогенных метанола и формальдегида в организме млекопитающих.....	61
3.2. Микрофлора желудочно-кишечного тракта генерирует эндогенный метанол.....	66
3.3. Повышение концентрации метаболитического метанола и ФА в сыворотке крови человека и млекопитающих сопровождается активизацией кластера генов, ответственных за метаболизм коротких спиртов.....	71
3.1. Эндогенный антиоксидант альфа-липоевая кислота участвует в регуляции метаболизма эндогенного формальдегида.....	79
4. Обсуждение.....	87
4.1. Вклад пектинметилэстеразы растительной пищи в образование метанола и ФА.....	87
4.2. Конкурентное ингибирование алкогольдегидрогеназы класса 1 этанолом и 4-метилпиразолом приводит к накоплению метанола и ФА в организме человека и животных.....	89
4.3. Метанол участвует в регуляции экспрессии генов мозга и печени мышей.....	93
4.4. Эндогенный антиоксидант альфа-липоевая кислота участвует в поддержании низкого уровня ФА у млекопитающих.....	96
5. Выводы.....	98
6. Список литературы.....	99

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

СУР2Е1 – цитохоксидаза Р450 2Е1

4-МП – 4-метилпиразол

АДГ1 – алкогольдегидрогеназы I класса

АлДГ2 – альдегиддегидрогеназа 2

АЛК – альфа-липоевая кислота

АЛТ — аланинаминотрансфераза

АСТ — аспаратаминотрансфераза

БА – болезнь Альцгеймера

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДГК — диоксигеназа галловой кислоты

ДГЛК – дигидролипоевая кислота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТТ – дитиотреитол

ДФР – дигидрофолатдегидрогеназа

кОТ-ПЦР – количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ММО – метаномоноксигеназа

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

МС – метионинсинтаза

МТДГ – метилентетрагидрофолатдегидрогеназа

МТР – метилентетрагидрофолатредуктаза

НАД — никотинамидадениндинуклеотид

НАДФ - никотинамидадениндинуклеотидфосфат

ПМЭ - пектинметилэстераза

РНК – рибонуклеиновая кислота

СГМТ – сериновая гидроксиметилтрансфераза

ТГФ – тетрагидрофолат

ТС – тимидилатсинтаза

ТХУ — трихлоруксусная кислота

ФА – формальдегид

ФДГ - формальдегиддегидрогеназа

ФР – физиологический раствор

ФТФДГ – формилтетрагидрофолатдегидрогеназа

ЩФ – щелочная фосфатаза

В данной работе также использованы следующие стандартные сокращения:

- единиц измерения метрической системы СИ,
- названий нуклеотидов,
- названий аминокислот в трехбуквенном коде.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования.

Метанол является естественным метаболитом млекопитающих и растений. Его свойства как летучего органического соединения, выполняющего сигнальную функцию в растительном царстве, хорошо описаны. Однако данные об источниках метанола и механизмах его образования в организме млекопитающих оставались крайне скупы. Образующийся в результате окисления метанола токсичный формальдегид (ФА) формирует сшивки между биополимерами, что приводит к ошибкам в транскрипции, к деградации и агрегации белков. В связи с чем, повышенное содержание эндогенного ФА связывают с развитием патологий, в том числе центральной нервной системы. Тем не менее, в настоящее время неизвестны способы, позволяющие регулировать его уровень в организме млекопитающих.

Степень разработанности темы.

Впервые метанол был обнаружен в выдыхаемом воздухе здоровых добровольцев в 1963 г. Последующие исследования обнаружили его невысокие концентрации во всех биологических жидкостях человека и модельных животных. Несмотря на многочисленные подтверждения присутствия метанола в организме млекопитающих, вопрос об его эндогенных источниках оставался открытым. Были получены первичные данные о растительной пище как генераторе метанола, однако механизм его образования был неясен. Высказывались предположения об участии микрофлоры желудочно-кишечного тракта в формировании и утилизации метанола, однако отсутствовали экспериментальные подтверждения. Наряду с регуляцией метаболизма метанола, актуальной задачей оставалось исследование механизмов управления метаболизмом ФА в связи с его токсичными свойствами.

Цели и задачи.

Цель работы была сформулирована как изучение молекулярно-биологических основ контроля эндогенного метанола и ФА в организме млекопитающих, в связи с чем были поставлены следующие задачи:

- 1) Оценить роль пектинметилэстеразы (ПМЭ) и пектина растительной пищи как источника метанола в организме мыши и человека,
- 2) Определить динамику образования эндогенного метанола и ФА и оценить вклад микрофлоры желудочно-кишечного тракта,
- 3) Изучить влияние эндогенного метанола на транскрипцию кластера генов метаболизма метанола,
- 4) Исследовать эндогенный антиоксидант альфа-липоевую кислоту (АЛК) как регулятор метаболизма метанола и ФА.

Научная новизна.

Впервые получены экспериментальные подтверждения участия ПМЭ растительной пищи в образовании метанола в организме человека и мыши. Хроматографический анализ сыворотки крови добровольцев и мышей после приема ингибиторов окисления метанола позволил оценить динамику накопления метанола и ФА. Показано, что удаление желудочно-кишечного тракта совместно с введением ингибиторов метаболизма метанола у крысы приводит к снижению темпов образования метанола, что впервые экспериментально подтверждает статус микрофлоры кишечника в качестве источника метанола. Полногеномные исследования изменений уровня мРНК в ответ на повышенную концентрацию эндогенного метанола выявили участие метанола в регуляции собственного метаболизма и позволили предположить его сигнальную функцию. Впервые было показано, что эндогенный антиоксидант альфа-липоевая кислота активирует окисление ФА через альдегиддегидрогеназу 2 (АлДГ2).

Теоретическая и практическая значимость работы.

В работе впервые были разработаны и протестированы молекулярно-биологические подходы регуляции метаболизма эндогенного метанола и ФА, основанные на употреблении растительной пищи, ингибировании переработки метанола и введении альфа-липоевой кислоты (АЛК), а также определены механизмы, лежащие в основе их действия. Репутация метанола как смертельного яда связана с токсичным воздействием продуктов его окисления на клетки животных. Тем не менее, метанол в низких концентрациях является неотъемлемой частью метаболизма млекопитающих. Нарушения в регуляции его уровня вовлечены в развитие патологий, в том числе нейродегенеративных. Изучение подходов, направленных на регуляцию метаболизма эндогенного метанола и выявление источников эндогенного метанола, необходимо для полноценного

понимания механизмов развития патологий центральной нервной системы и разработки методик их профилактики и лечения.

Положения, выносимые на защиту:

1. ПМЭ растительной пищи ответственна за образование метанола и ФА в организме животных и человека.
2. Конкурентное ингибирование алкогольдегидрогеназы класса 1 (АДГ1) приводит к накоплению метанола и ФА в организме человека и животных.
3. Повышение концентрации метаболического метанола и ФА в сыворотке крови человека и млекопитающих сопровождается активизацией кластера генов, ответственных за метаболизм коротких спиртов.
4. Эндогенный антиоксидант АЛК участвует в поддержании низкого уровня ФА у млекопитающих, контролируя, активность АДГ2.

Методология и методы исследования.

Анализ уровня мРНК генов осуществлялся на микроматрицах и с использованием количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (кОТ-ПЦР). Концентрации метанола и этанола определялись методом газовой хроматографии с пламенно-ионизирующим детектором. Измерение концентрации ФА проходило на высокоэффективной жидкостной хроматографии после его дериватизации. Измерение активности ферментов проводили методом спектрофотометрии.

Личный вклад соискателя.

Личный вклад заключался в анализе данных литературы, постановке экспериментов, обработке полученных экспериментальных данных и их интерпретации, подготовке публикаций.

Степень достоверности.

Достоверность полученных данных подтверждается большим количеством воспроизводимых результатов, их статистической обработкой и публикацией в рецензируемых журналах.

Апробация результатов.

Результаты были представлены на 39th FEBS Congress, Париж, Франция, 30 августа - 4 сентября 2014 года, 6th EMBO Meeting, Бирмингем, Великобритания, 5-8 сентября 2015 года, 10th FENS Forum of Neuroscience, Копенгаген, Дания, 2-6 июля 2016 года и на V Съезде Биохимиков России, Сочи, Россия, 4-8 октября 2016 года.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них 4 статьи в рецензируемых международных журналах, входящих в перечень ВАК РФ, и 4 материала отечественных и международных конференций.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа изложена на 123 страницах и состоит из введения, списка сокращений, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 216 ссылок. Диссертация содержит 35 рисунков и 20 таблиц.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. МЕТАБОЛИЗМ ЭНДОГЕННОГО МЕТАНОЛА И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ

Впервые метанол был обнаружен еще в середине XVII века Робертом Бойлем при изучении продуктов перегонки древесины. Но лишь в XX веке произошло множество открытий, расширивших наши знания о его значении в жизнедеятельности живых организмов. Метанол давно нашел свое применение как биотопливо. Неожиданным оказалось, что полив хлопчатника 10%-ным раствором метанола приводит к повышению урожайности. Позже нашлось частичное объяснение этому феномену: метанол, наряду с углекислым газом, может служить источником углерода для растений (Cossins, 1964), а также для бактерий (Salem et al., 1972) и грибов (Tye and Willetts, 1977). В тоже время, многие живые организмы способны образовывать метанол как продукт жизнедеятельности. Например, растения генерируют метанол при повреждениях (Fall and Benson, n.d.; Nemesek-Marshall et al., 1995), некоторые бактерии образуют метанол из метана (Patel et al., 1978), множество бактерий и грибов способны отщеплять метильные группы полисахарида пектина с образованием метанола (Siragusa et al., 1988), а также синтезировать метанол в пути биосинтеза биотина (Lin et al., 2010). Несмотря на репутацию яда, метанол сам по себе безвреден для клеток млекопитающих (Kostic and Dart, 2003) и присутствует в микромолярных концентрациях у людей и других животных. Например, следы метанола были обнаружены в выдыхаемом воздухе здоровых добровольцев (Enderby et al., 2009; Turner et al., 2006). Также было показано, что метанол присутствует в биологических жидкостях человека и модельных организмов (Batterman et al., 1998; Batterman and Franzblau, 1997a; Chuwers et al., 1995; Dorokhov et al., 2012; Pronko et al., 1997; Shindyapina et al., 2014). Несмотря на широкое распространение метанола в природе и быстро накапливающиеся знания о нем, до сих пор была слабо изучена его биологическая роль, возможная сигнальная функция и источники в организме млекопитающих.

1.1. Источники метанола в организме млекопитающих

Все потенциальные источники метанола в организме млекопитающих можно условно разделить на экзогенные и эндогенные. К первым мы будем относить те, при которых метанол или непосредственный субстрат, на основе которого генерируется метанол, вносится извне (с пищей или дыханием), в качестве эндогенных источников будем рассматривать те, при которых метанол образуется из субстратов, находящихся в организме животного.

Экзогенные источники. Отравления метанолом

Метанол в первую очередь ассоциируется с клиническими случаями отравлений некачественными алкогольными напитками, благодаря чему имеет репутацию яда. Также известны случаи отравлений парами метанола на производствах (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012).

Однако малоизвестным остается тот факт, что растительная пища также может быть его источником. Было показано, что листья растений выбрасывают в атмосферу метанол через устьица (MacDonald and Fall, 1993), а также при повреждениях клеточной стенки (Nemesek-Marshall et al., 1995). Реакцию с образованием метанола катализирует ПМЭ, представленная в клеточной стенке растений в большом количестве. В связи с чем было выдвинуто предположение, что необработанные продукты растительного происхождения могут быть источником метанола в организме человека. Действительно, первые работы на добровольцах, которые принимали в пищу яблоки или чистый пектин, выявили значительное повышение концентрации метанола в выдыхаемом воздухе испытуемых (Lindinger et al., 1997). Предположительно, гидролиз сложноэфирных связей галактуроновой кислоты пектина с метанолом в организме человека может происходить за счет работы растительной или бактериальной ПМЭ, а, возможно, при участии обеих. Например, известно, что в микрофлоре кишечника млекопитающих представлена значительная группа бактерий, содержащих активную ПМЭ. Добавление бактерий из микрофлоры кишечника людей к пектину приводит к повышению концентрации метанола в среде (Siragusa et al., 1988).

1.2. Источники эндогенного метанола и формальдегида

Помимо привнесенного извне с диетой и с вдыхаемым воздухом метанола, у всех здоровых людей в крови детектируется физиологический метанол (Batterman et al., 1998; Batterman and Franzblau, 1997a; Chuwers et al., 1995; Dorokhov et al., 2012; Pronko et al., 1997; Shindyapina et al., 2014), который образуется из эндогенных источников. Метанол и продукты его окисления являются важнейшими участниками молекулярно-биологических процессов в клетке, включая метилирование, синтез пуринов и аминокислот.

Деметилирование

Окислительное деметилирование проходит с высвобождением ФА, в то время как в ходе реакции гидролиза сложных эфиров образуется метанол. Например, у млекопитающих с образованием ФА проходит деметилирование ДНК при участии белков АВН2 и АВН3 (Aas et al., 2003), деметилирование РНК по N6-метиладенозину ферментом FTO (Gerken et al., 2007), а также гистонов по лизину и аргинину ферментами семейства PADI и содержащих домен JmjC (Cuthbert et al., 2004; Forneris et al., 2006; Tsukada et al., 2005). Деметилирование с образованием метанола встречается реже и осуществляется, например, при гидролизе сложных эфиров карбоксильных групп боковых радикалов аспарагиновой и глутаминовой кислот с метанолом (Sprung et al., 2008). Аналогичная реакция катализируется метилэстеразой глутамина белков прокариот, участвующая в хемотаксисе бактерий (Toews and Adler, 1979). Одинаковые реакции деметилирования карбоксильных групп белков, катализируемые в прокариотах и эукариотах, по-видимому, производят негомологичные ферменты. Так, в геноме эукариот не было обнаружено генов с похожей на CheR последовательностью (Low et al., 2014). Несмотря на то, что деметелирующая активность тканей крыс относительно метилированных боковых цепей карбоновых кислот была показана более 30 лет назад, до сих пор не обнаружен фермент, катализирующий данную реакцию (Gagnon et al., 1984).

Семикарбазид-чувствительные аминоксидазы

Другим метаболическим источником ФА выступает путь распада креатина, в котором он образуется при деаминации метиламина семикарбазид-чувствительными аминоксидазами (SSAO, EC 1.4.3.21) (Jalkanen and Salmi, 2001; Yu et al., 2003).

Микрофлора кишечника

Значительный вклад в образование эндогенного метанола вносит микрофлора. Микрофлора кишечника изучена лучше всего, в связи с чем будет рассмотрена в данном обзоре детальнее. В кишечнике человека и мыши живет огромное количество бактерий, в ходе метаболизма которых потенциально образуется метанол, в основном как побочный продукт реакций. Метанол является продуктом реакций двух типов: окислительно-восстановительные или гидролиз сложноэфирных связей (Таблица 1.1.).

Таблица 1.1. Список бактериальных ферментов, образующих метанол в качестве продукта реакции. ОВР – окислительно-восстановительная реакция, АСБ - ацил-содержащий белок.

Фермент	Субстрат	Тип реакции	Ссылка
Пектинметилэстераза	Пектин	Гидролиз	(Siragusa et al., 1988)
Метанмонооксигеназа	Метан, O ₂	ОВР	(Lipscomb et al., 2005)
Формальдегиддисмутаза	Формальдегид	ОВР	(Kato et al., 1986)
Диоксигеназа галловой кислоты	3-О-Метил галловая кислота, O ₂	ОВР	(Donnelly and Dagley, 1980)
4-метилоксалоацетатэстераза	4-метилоксалоацетат	Гидролиз	(Donnelly and Dagley, 1980)
Фермент биосинтеза биотина BioH	Метиловый эфир пимелоила- [АСБ*]	Гидролиз	(Lin et al., 2010)

Метилэстераза глутамата белков	Метилвый эфир глутамата белков	Гидролиз	(Toews and Adler, 1979)
-----------------------------------	-----------------------------------	----------	----------------------------

Пектинметилэстераза (ПМЭ)

Большую часть продуцентов метанола представляют бактерии, способные отщеплять метильные группы от пектина (Рисунок 1.1.) с помощью ПМЭ [ЕС:3.1.1.11]. ПМЭ является секретируемым мембранным белком, который встречается во всех клеточных стенках растений и у некоторых бактерий, в частности, у представителей микрофлоры кишечника (Siragusa et al., 1988).

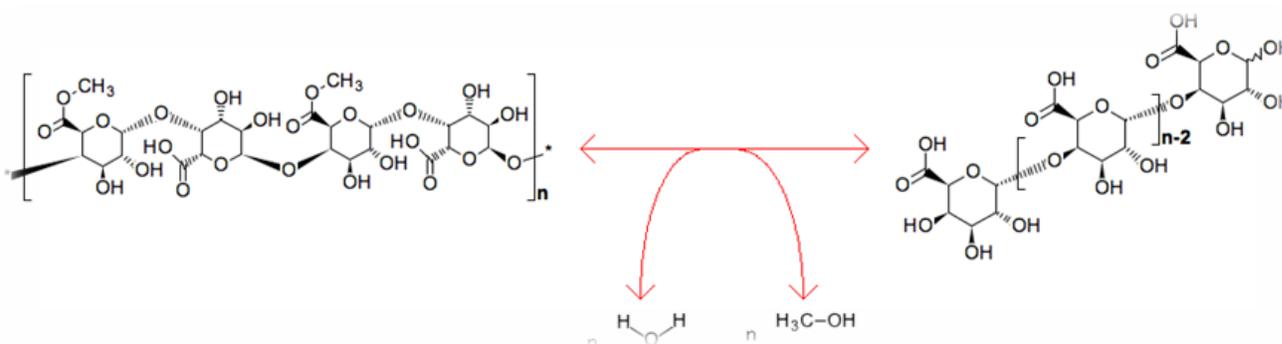
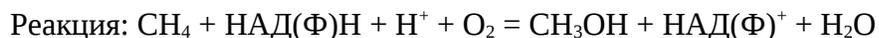


Рисунок 1.1. Схема реакции деметилирования пектина пектинметилэстеразой.

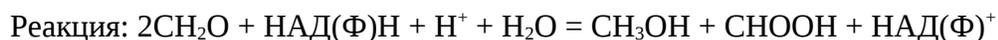
Метанмонооксигеназа

К группе продуцентов метанола также относятся аэробные бактерии, кодирующие фермент метанмонооксигеназу (ММО) [ЕС: 1.14.13.25]. У прокариот выделяют растворимую форму ММО (sММО) и мембранную форму (pММО). sММО способна окислять широкий спектр субстратов, среди которых присутствует метан. Фермент pММО, локализованный в мембране, обладает большей специфичностью, чем растворимая форма фермента, и способен окислять меньшее количество субстратов. Для проведения реакций окисления pММО и sММО необходим кислород, который взаимодействует с Fe-Fe кластером (Lipscomb, 1994), поэтому реакция окисления метана в метанол протекает только в аэробных условиях.



Формальдегиддисмутаза

Фермент катализирует необычную реакцию диспропорционирования, где ФА выступает как донор и акцептор электронов одновременно. Формальдегиддисмутаза (ФД) впервые была обнаружена у *Pseudomonas putida* F 61 (Kato et al., 1986). На данный момент установлено несколько видов бактерий, несущих ген, кодирующий ФД. Однако пока в микрофлоре не удалось обнаружить распространенных видов бактерий, в геноме которых бы была закодирована ФД.



Диоксигеназа галловой кислоты

Диоксигеназа галловой кислоты участвует в пути расщепления аминокислоты (KEGG: m00627). Одним из субстратов фермента выступает 3-О-метил галловая кислота, производное известного антиоксиданта - галловой кислоты. Для проведения реакции ферменту необходим кислород (Рисунок 1.2), в связи с чем, диоксигеназа галловой кислоты работает только в аэробных условиях. Впервые она была обнаружена у *Pseudomonas* sp. и описана у *Pseudomonas putida* (Donnelly and Dagley, 1980; Kersten et al., 1982). Стоит отметить, что данная реакция является частью важного метаболического пути катаболизма ароматических соединений у бактерий.

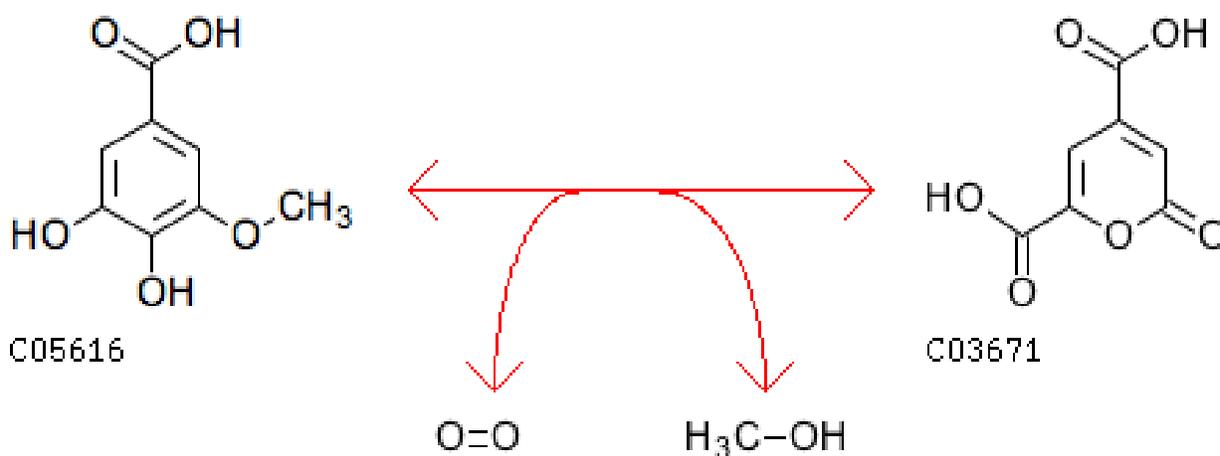


Рисунок 1.2. Схема реакции окисления 3-о-метил галловой кислоты с образованием метанола диоксигеназой галловой кислоты (идентификатор реакции в базе данных KEGG: R04280).

4-метилоксалоацетатэстераза

4-метилоксалоацетатэстераза участвует в расщеплении аминокислоты, катализируя одну из реакций альтернативного пути превращения 3-О-метилгалловой кислоты (Рисунок 1.3). Как и диоксигеназа галловой кислоты, 4-метилоксалоацетатэстераза впервые была обнаружена у представителя рода *Pseudomonas* (Donnelly and Dagley, 1980), и играет важную роль в катаболизме ароматических соединений.

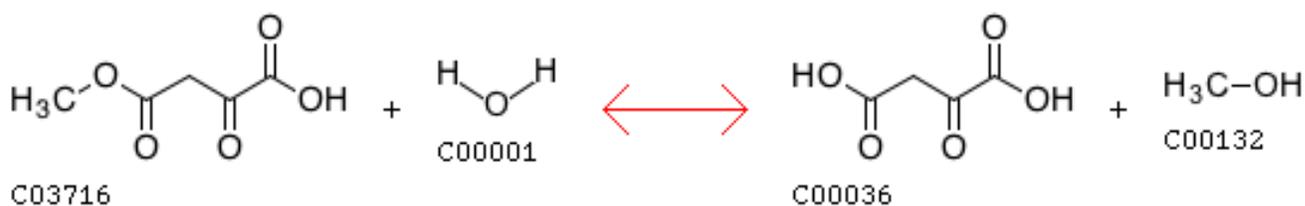


Рисунок 1.3. Схема реакции окисления 4-метилоксалоацетата с образованием метанола 4-метилоксалоацетат эстеразой (идентификатор реакции в базе данных KEGG: R01144).

Метилэстераза глутамата белков

Еще одну реакцию гидролиза сложноэфирной связи с метанолом катализирует метилэстераза глутамата белков (МГБ), кодируемая геном *CheV* (Рисунок 1.4.). Интересно, что данная реакция катализируется не только бактериями, но и клетками эукариот, в том числе человека. Бактериям МГБ необходима, в первую очередь, для осуществления хемотаксиса. В условиях низкой концентрации аттрактанта или высокой концентрации репеллента, каскад фосфорилирования белков приводит к метилированию основного рецептора хемотаксиса метилазой *CheR*, в результате чего бактерия меняет направление движения в окружающей среде. При увеличении концентрации аттрактанта *CheV* гидролизует сложноэфирную связь метанола с глутаминовыми кислотами рецептора хемотаксиса, в результате подавляется каскад реакций, приводящий к смене направления движения (Porter et al., 2011; Toews and Adler, 1979).

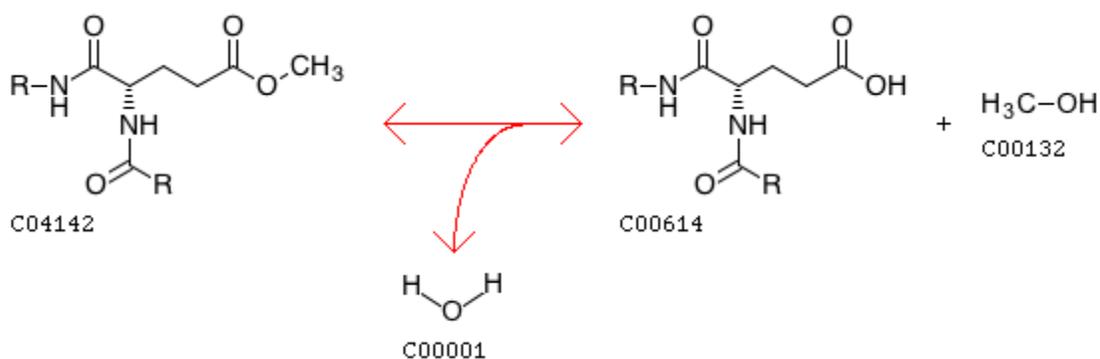


Рисунок 1.4. Схема реакции гидролиза метилового эфира глутамата с образованием метанола метилэстеразой глутамата белков (идентификатор реакции в базе данных KEGG: R02624).

Фермент биосинтеза биотина BioH (BioH)

BioH катализирует одну из реакций синтеза биотина грамм-отрицательными бактериями (Рисунок 1.5.). Ее активный центр содержит классическую для гидролаз триаду Ser-His-Asp (Sanishvili et al., 2003). За счет гидролиза сложноэфирной связи, BioH высвобождает молекулу метанола. Синтез витаминов группы B (в том числе биотина) у млекопитающих происходит только в микрофлоре (Fridericia et al., 1927). Растения и бактерии синтезируют биотин из пимелоил-КоА в консервативном пути катаболизма из четырех реакций, осуществляемых ферментами BioF, BioA, BioD и BioB (Rodionov et al., 2002). У грамм-отрицательных бактерий, например, у *E. coli*, пимелоил-КоА синтезируется ферментами BioC и BioH из L-аланина и/или уксусной кислоты (Barker and Campbell, 1980; Ifuku et al., 1994). Ген *BioC* найден у многих бактерий, в то время как *BioH* редко кодируется в тех же геномах и чаще встречается вместе с *BioG* и *BioK* (Rodionov et al., 2002). У некоторых грамм-положительных бактерий, включая *Bacillus sphaericus* и *Bacillus subtilis*, пимелоил-КоА синтезируется из пимелоиновой кислоты без участия *BioH* ферментом пимелоил-КоА синтетазой *BioW* (Bower et al., 1996; Gloeckler et al., 1990). Среди бактерий микрофлоры кишечника *BioH* встречается достаточно часто, чтобы предполагать его роль в образовании эндогенного метанола. Так, была показана его активность в одной из самых представленных бактерий микробиома – *E. coli* (Sanishvili et al., 2003).

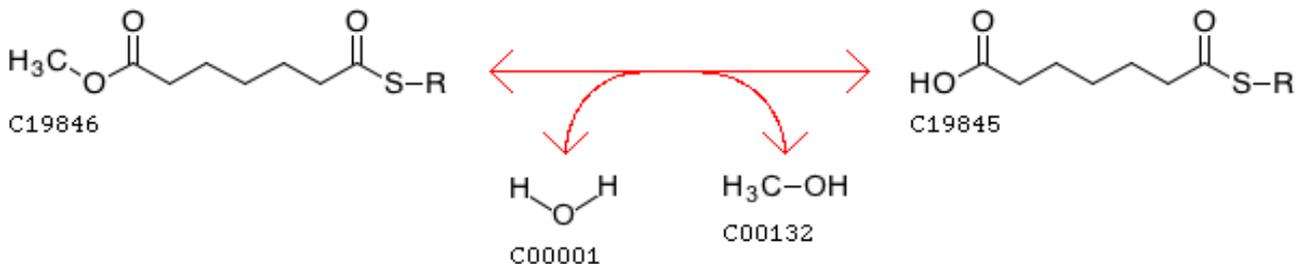


Рисунок 1.5. Схема реакции гидролиза сложноэфирной связи пимелоил-АСБ с метанолом ферментом BioH (идентификатор реакции в базе данных KEGG: R09725). АСБ – ацил-содержащий белок.

В микрофлоре человека представлены бактерии, в геноме которых закодированы ПМЭ, МГБ и фермент биосинтеза биотина BioH (Dorokhov et al., 2015). В качестве эндогенного источника метанола имеет смысл рассматривать только те реакции, для которых все субстраты являются эндогенными. В связи с чем, растительная ПМЭ не может вносить вклад в синтез эндогенного метанола, детектируемого натоцк, так как метилированный пектин поступает в организм человека только с необработанной растительной пищей. В то же время, биоинформатический анализ показывает, что существует немного видов бактерий, несущих гены ММО и ДГК, и они крайне редко встречаются в микрофлоре кишечника млекопитающих. Оба фермента используют кислород в качестве субстрата. Учитывая тот факт, что микрофлора кишечника на 99% состоит из анаэробных бактерий (Steinhoff, 2005) реакции с участием кислорода, вероятно, проходят крайне редко и вряд ли синтезируют метанол в значительных концентрациях. Фермент биосинтеза биотина BioH и МГБ, по-видимому, могут являться источником эндогенного метанола в микрофлоре кишечника, так как отвечают основным требованиям на эту роль – кодирующих их гены широко представлены в метагеноме, оба используют эндогенные субстраты и участвуют в базовых метаболических процессах (Lin et al., 2010).

1.3. Выведение коротких спиртов из организма млекопитающих

Важным регулятором концентрации коротких спиртов у животных выступают процессы его выведения. Выведение веществ из организма животных происходит посредством физиологического и метаболического клиренсов. В первом случае соединение выводится в

неизменном состоянии, например, через пот, с мочой и с выдыхаемым воздухом, что особенно характерно для молекул небольшого размера, летучих и амфифильных соединений.

Физиологический клиренс

Около 10% этанола выводится из организма человека посредством физиологического клиренса, из них 1,5 – 3% (Norberg et al., 2002; Vestal et al., 1977), в зависимости от дозы этанола, выводят почки, остальное уходит с выдыхаемым воздухом и, в меньшей степени, с потом. Процесс выведения этанола через дыхание начинается раньше остальных (Norberg et al., 2002), что, по-видимому, связано с его летучестью. Важно отметить, что с возрастом физиологический клиренс этанола немного замедляется в связи с возрастными изменениями в мышечной массе, состоянием сосудов и других органов (Vestal et al., 1977). Из-за высокой токсичности продуктов окисления метанола, до сих пор неизвестны его фармакокинетические параметры в организме человека (без введения этанола и фомепизола, ингибитора АДГ), и немного известно о физиологическом клиренсе у других млекопитающих. Тем не менее, было определено, что скорость окисления метанола у приматов выше, чем у грызунов, и как следствие, выше скорость накопления ФА (Sweeting et al., 2010), что, вероятно, связано с различиями между ними в метаболическом клиренсе. Физико-химические свойства метанола и этанола довольно близки, что позволяет предположить схожую фармакокинетику.

Метаболический клиренс: первая стадия окисления метанола и этанола

Окисление метанола до ФА у млекопитающих осуществляется тремя путями: через алкогольдегидрогеназы I класса, цитохромоксидазу P450 2E1 и каталазу (Рисунок 1.6.).

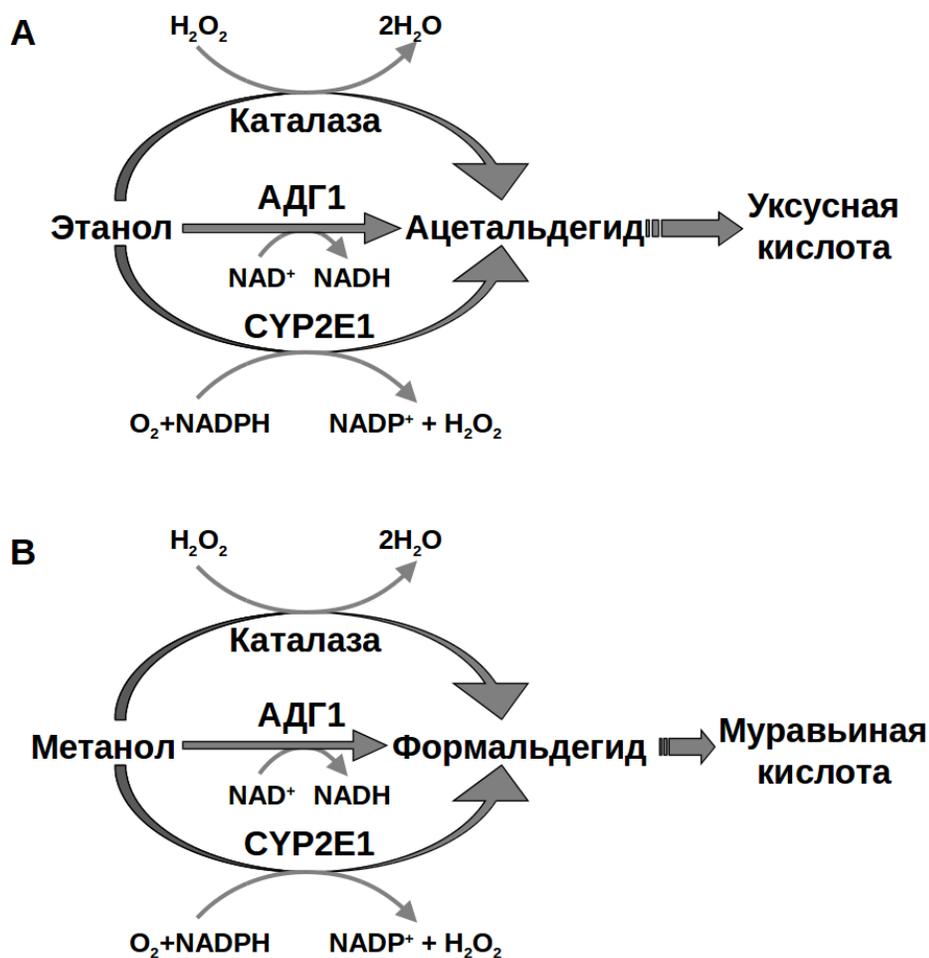


Рисунок 1.6. Схема первой стадии окисления (а) этанола и (б) метанола у человека и мыши. АДГ1 – алкогольдегидрогеназы I класса, СYP2E1 – цитохроксидаза P450 2E1.

У людей до 9% экзогенно поступающего этанола окисляет цитохром P450 монооксигеназа 2E1 [ЕС 1.14.13.n7] (Coop and Коор, 1987), кодируемая геном *CYP2E1*. Каталаза (ген *CAT*) [ЕС 1.11.1.6] ответственна за окисление 1% экзогенного этанола в организме человека. Алкогольдегидрогеназы окисляют до 90% этанола в печени, и в организме млекопитающих представлены семью классами, выделеными по принципу субстратной специфичности, структуры и способности пиразола и его производных ингибировать их активность. Например, алкогольдегидрогеназы III класса вообще не ингибируются пиразолами (Parés and Vallee, 1981), в то время, как алкогольдегидрогеназы II класса ингибируются ($K_i = 2 \text{ мМ}$) (Bosron et al., 1979), но значительно хуже, чем класс I ($K_i = 0,2 \text{ мкМ}$) (Li and Theorell, 1969).

Алкогольдегидрогеназы

Алкогольдегидрогеназы I класса играют ключевую роль в метаболизме коротких спиртов, окисляя до 90% экзогенных метанола и этанола в печени человека. Данный класс ферментов у человека представлен тремя изоформами: алкогольдегидрогеназой 1A, полипептид α , алкогольдегидрогеназой 1B, полипептид β (изоформы $\beta 1$, $\beta 2$, старое название ADH2) и алкогольдегидрогеназой 1C, полипептид γ (изоформы $\gamma 1$, $\gamma 2$, старое название ADH3) (Smith et al., 1973a, 1973b). Для их функционирования необходим НАД⁺ и два иона цинка: один расположен в активном центре и координирует субстрат, второй играет структурную роль (Colonna-Cesari et al., 1986). Фермент работает в виде гомо- и гетеродимеров, которые сильно похожи по субстратной специфичности и в основном окисляют алифатические первичные и вторичные спирты C₁-C₈ до соответствующих альдегидов и кетонов. При этом аффинность связывания спиртов тем выше, чем длиннее их углеродная цепочка при схожих скоростях окисления (Fong and Keung, 1987; Wagner et al., 1983). Таким образом, основными субстратами алкогольдегидрогеназ I класса являются длинные алифатические спирты, что, вероятно, связано с лучшим взаимодействием длинных углеродных остовов с гидрофобным карманом в активном центре фермента. У гомодимера $\beta 1\beta 1$ одна из самых низких K_m относительно этанола, которая в зависимости от pH колеблется в пределах 0,05 – 1,2 мМ (Bosron et al., 1983; Wagner et al., 1983), и самая низкая K_m для метанола (2 - 6 мМ) (Lee et al., 2011; Wagner et al., 1983) (Таблица 1.2.).

Таблица 1.2. K_m для основных димеров алкогольдегидрогеназ I класса человека с метанолом и этанолом при физиологическом (7,5) или основным (9-10) pH. “-” обозначает отсутствие данных.

K _m (мМ)	$\beta 1\beta 1$	$\beta 2\beta 2$	$\gamma 1\gamma 1$	$\gamma 2\gamma 2$	$\alpha\alpha$	$\alpha\gamma 2$	$\alpha\gamma 1$	$\alpha\beta 1$	$\alpha\beta 2$	$\beta 1\gamma 1$	$\beta 1\gamma 2$	$\beta 2\gamma 1$	$\beta 2\gamma 2$
Этанол, pH 9-10	1,6	3,2	3,2	1,7	1,5	1,6		2	3,4	1,1	1,4	3,7	3,1
Этанол, pH 7,5	0,05	1	0,12	0,16	4,7	-	-	-	-	-	-	-	-
Метанол, pH 9-10	6	39	74	30	-	-	150	15	62	21	18	94	21
Метанол, pH 7,5	2	290	570	180	2600	-	-	-	-	-	-	-	-

Стоит отметить, что при близком к физиологическому рН аффинность связывания алкогольдегидрогеназ с метанолом и этанолом на 1-2 порядка выше, чем при основном рН, что говорит о чувствительности фермента к концентрации протонов водорода. В цитоплазме клеток человека, где локализуются алкогольдегидрогеназы, значения рН близки к нейтральным, и K_m гомодимеров $\beta_1\beta_1$ относительно метанола и этанола составляют 0,05 и 2 мМ, соответственно. Согласно Таблице 1.1 гомодимер $\beta_1\beta_1$ на порядок сильнее связывает метанол, чем остальные димеры. Это отличает его от этанола, где несколько димеров имеют сопоставимые K_m , что говорит об исключительной роли *ADH1B* в окислении метанола.

У человека полипептиды α , β и γ закодированы генами *ADH1A*, *ADH1B* и *ADH1C*, соответственно, тогда как в геноме грызунов I класс алкогольдегидрогеназ представлен одним геном – *ADH1*. Их экспрессия крайне тканеспецифична как у приматов, так и у грызунов, и значительно сильнее выражена в печени, кишечнике и жировой ткани, чем в остальных органах (Таблица 1.3.) (Galter et al., 2003; Pontén et al., 2009). Интересно, что экспрессия и уровень белковых продукта генов, кодирующих алкогольдегидрогеназы I, II и IV классов, в мозге практически равны нулю или ниже порога обнаружения (Galter et al., 2003; Pontén et al., 2009).

Таблица 1.3. Доля EST, выраженная в виде числа транскриптов на миллион, у человека (*H. sapiens*), мыши (*M. musculus*) и крысы (*R. norvegicus*) в ряде органов и тканей для алкогольдегидрогеназ. Данные взяты из базы данных Unigene (www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/). (EST - expressed sequence tags).

Ткань/орган	<i>H. sapiens</i>				<i>M. musculus</i>	<i>R. norvegicus</i>
	<i>ADH1B</i>	<i>ADH4</i>	<i>ADH6</i>	<i>ADH7</i>	<i>ADH1</i>	<i>ADH1</i>
Жировая ткань	4585	0	0	0	0	0
Надпочечники	789	0	0	0	0	0
Головной мозг	24	0	1	0	0	0
Соединительная ткань	73	0	0	0	0	0
Глаз	9	0	0	19	26	0
Сердце	603	0	55	0	18	0
Почки	42	0	84	0	865	495
Печень	1373	729	252	0	2756	1619
Легкие	167	0	0	40	150	87
Мышечная ткань	112	0	8	17	405	0

Алкогольдегидрогеназа III класса, кодируемая геном ADH5, распределена равномерно по органам млекопитающих (Pontén et al., 2009), но не участвует в окислении этанола и метанола (Wagner et al., 1984).

Цитохромоксидазы P450

Белки семейства цитохромоксидаз P450 объединены по принципу высокого процента идентичности аминокислотных последовательностей и наличию гема в активном центре. Среди их субстратов присутствует этанол, метанол, стероиды, жирные кислоты и различные ксенобиотики (Cederbaum, 2012a, p. 1; Konstandi et al., 2014; Krau, 2013; Lu and Cederbaum, 2008, p. 1; Zanger and Schwab, 2013). Гем в активном центре цитохромоксидаз P450 активирует молекулу кислорода для встраивания одного из ее атомов в субстраты (Anzenbacher and Anzenbacherová, 2001). Впервые CYP2E1 была выделена как часть фракции микросом из эндоплазматического ретикулума (Lieber, 2004, 1999; Lieber and DeCarli, 1968), но позже была обнаружена и в митохондриях (Avadhani et al., 2011; Bai and Cederbaum, 2006). Несмотря на небольшой вклад CYP2E1 в метаболизм эндогенных коротких спиртов, она играет важную роль в окислении их высоких концентраций и адаптации к высоким концентрациям этанола при алкоголизме благодаря способности этанола увеличивать его экспрессию (Cederbaum, 2012b; Lieber, 2004). Также как и алкогольдегидрогеназы I класса, CYP2E1 преимущественно экспрессируется в печени (Таблица 1.4.) (Pontén et al., 2009).

Таблица 1.4. Доля EST для гена CYP2E1, кодирующего цитохромоксидазу P450 2E1, выраженная в числе транскриптов на миллион, у человека (*H. sapiens*) и крысы (*R. norvegicus*) в ряде органов и тканей. Данные взяты из базы данных Unigene (www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/). (EST - expressed sequence tags). Данные для мыши (*M. musculus*) не представлены в связи с их отсутствием в базе данных.

Ткань/орган	<i>H. sapiens</i>	<i>R. norvegicus</i>
Жировая ткань	0	172
Надпочечники	0	0
Головной мозг	18	0
Соединительная ткань	0	0
Эмбрион	0	0
Глаз	0	0
Сердце	0	32
Почки	0	450
Печень	852	2988
Легкие	29	0
Мышечная ткань	9	0
Яичники	29	60
Поджелудочная железа	0	59
Гипофиз	0	0
Плацента	0	0

У эмбрионов активность CYP2E1 в печени не детектируется, в то время как во взрослом организме является наиболее представленным ферментом из семейства и составляет около 6% от общего количества цитохроксидаз P450 в печени (Gonzalez, 2006). Транскрипция CYP2E1 регулируется уровнем этанола в крови, в связи с чем именно ее активность связывают с адаптацией высоким концентрациям спирта при алкоголизме (Badger et al., 1993; Ronis et al., 1993). Так, скорость окисления этанола повышается вместе с увеличением концентрации этанола в крови. Помимо детоксификации метанола и этанола, CYP2E1 играет важную роль в метаболизме жирных кислот, осуществляя реакцию ω '-1, ω '-2 гидролиза (Adas et al., 1998; Amet et al., 1994; Laethem et al., 1993). К важным отличиям между катаболизмом метанола и этанола через CYP2E1 относят генерацию активных форм кислорода (Caro and Cederbaum, 2004; Lieber, 2004; Wu and Cederbaum, 2003). При повышении концентрации этанола в крови, CYP2E1 переключается на его окисление, что разобщает дыхательную цепь и приводит к генерации радикалов супероксид анионов и перекиси водорода. С повышением экспрессии CYP2E1 в митохондриях, эффект усиливается (Bai

and Cederbaum, 2006, p. 2). Усиление продукции активных форм кислорода ведет к снижению в митохондриях концентрации глутатиона – антиоксиданта, играющего важнейшую роль в защите клетки от окислительного стресса (Bai and Cederbaum, 2006). Хроническое употребление алкоголя приводит к активации CYP2E1, и, как следствие, к снижению антиоксидантной защиты и увеличению продукции активных форм кислорода, которые вступают в реакции с липидами мембран клетки (Avadhani et al., 2011; Cederbaum, 2006; Knockaert et al., 2011). Высокая нагрузка от окислительного стресса на печень при хроническом употреблении этанола способствует развитию алкогольной болезни печени (Cederbaum, 2006; Knockaert et al., 2011; Lieber, 2004).

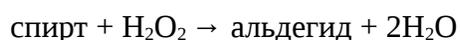
Каталаза

Третий путь окисления коротких спиртов осуществляет каталаза [EC 1.11.1.6] (Cederbaum and Qureshi, 1982; Keilin and Hartree, 1945). Как и у всех ферментов первой стадии окисления этанола, у каталазы самая высокая экспрессия в детоксифицирующих органах человека и мыши (Таблица 1.5.) (Brown et al., 1994; Pontén et al., 2009). Но в отличие от алкогольдегидрогеназ I класса и цитохромоксидазы P450 2E1, ее уровень равномернее распределен между остальными органами (Huttlin et al., 2010; Pontén et al., 2009), в связи с чем играет ключевую роль в окислении коротких спиртов в мозге и других органах, где алкогольдегидрогеназы I класса отсутствуют и малоактивна цитохромоксидаза P450 2E1 (Cohen et al., 1980; Wang et al., 2013; Zimatkin et al., 2006; Zimatkin and Buben, 2007).

Таблица 1.5. Доля EST для гена CAT, кодирующего каталазу, выраженное в числе транскриптов на миллион, у человека (*H. sapiens*), мыши (*M. musculus*) и крысы (*R. norvegicus*) в ряде органов и тканей. Данные взяты из базы данных Unigene (www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/). (EST - expressed sequence tags).

Ткань/орган	<i>H. sapiens</i>	<i>M. musculus</i>	<i>R. norvegicus</i>
Жировая ткань	155	0	344
Надпочечники	60	0	0
Головной мозг	43	46	0
Соединительная ткань	46	50	0
Эмбриональная ткань	14	152	134
Глаз	67	80	0
Сердце	100	128	163
Почки	85	404	586
Печень	306	1337	338
Легкие	62	320	43
Мышечная ткань	65	147	411
Яичник	0	54	121
Поджелудочная железа	79	0	0
Гипофиз	60	166	60

Как и в случае с CYP2E1, активный центр каталазы содержит гем, который с помощью тирозина координирует ион трехвалентного железа Fe³⁺ (Putnam et al., 2000). Гистидин каталитического центра активирует перекись водорода, которая через атом кислорода связывается с железом и, после ухода молекулы воды (Putnam et al., 2000), используется в качестве косубстрата-акцептора электрона и двух водородов в реакции окисления спиртов. Суммарная реакция выглядит следующим образом (Cederbaum, 2012b):



Однако низкая скорость образования перекиси водорода (4 мкмоль/г печени/час) лимитирует скорость окисления спиртов каталазой в детоксифицирующих органах (Cederbaum, 2012b). Аффинность связывания этанола с алкогольдегидрогеназами I класса у млекопитающих значительно выше, чем с каталазой. У человека K_m каталазы к метанолу и этанолу составляет 1,5-6,2 М (Tran et al., 2007), что на 3 порядка превышает концентрации метанола и этанола в крови людей при тяжелых отравлениях (5-30 mM) (Lachance et al., 2015; Rietjens et al., 2014; Zakharov et al., 2015). Более того, при концентрации метанола свыше 15,6 mM пациенту рекомендуется диализ.

Для каталазы, в случае антиоксидантных реакций, не характерна зависимость скорости реакции от концентрации субстрата согласно уравнению Михаэлиса-Ментен, в связи с чем кинетические параметры рассчитываются теоретически (Perkins et al., 1995). У крыс и мышей K_m каталазы к метанолу и этанолу не превышают нескольких мМ (Perkins et al., 1995; Vetrano et al., 2005), что в сочетании с практически равномерным распределением экспрессии каталазы по органам делает ее центральным ферментом в окислении коротких спиртов у грызунов. Более того, K_m каталазы к перекиси водорода у грызунов на порядок выше (25 мМ) (Vetrano et al., 2005), чем к метанолу и этанолу.

Таким образом, каталаза, по-видимому, совсем не участвует в окислении метанола и этанола у человека, но играет важную роль в окислении коротких спиртов у грызунов, особенно в мозге. Ацетальдегид, образующийся в результате работы каталазы в мозге грызунов, связывают с нейротоксичными эффектами этанола, его воздействием на поведение, нейрохимию и развитие алкоголизма (Correa et al., 2012; Muggironi et al., 2013).

Исследования на мышах с выключенными генами *CAT* и *CYP2E1* и с ингибиторами соответствующих ферментов на мышах и крысах показали, что до 10% этанола в мозге грызунов окисляется цитохрооксидазой P450 2E1, а ключевым ферментом является каталаза, окисляющая около 60% спирта (Zimatkin et al., 2006). Оба фермента у грызунов обладают значительно меньшей аффинностью ($K_m=9-12$ мМ) к этанолу (Thurman et al., 1972; Zakhari, 2006), чем алкогольдегидрогеназы I класса, что, видимо, значительно снижает скорость его окисления в мозге по сравнению с печенью, кишечником и жировой тканью, особенно в физиологических концентрациях (Таблица 1.6.). В клетках приматов в окислении метанола и этанола в первую очередь участвуют цитохрооксидаза P450 2E1 и алкогольдегидрогеназы I класса, уровень белка и мРНК которых в мозге фактически равны нулю, и окисление метанола и этанола, по-видимому, там не происходит. Предположительно, как у грызунов, так и у приматов такое распределение ролей в окислении коротких спиртов между органами необходимо для защиты клеток центральной нервной системы от токсичного воздействия ФА и ацетальдегида.

Таблица 1.6. K_m (мМ) для трех путей первой стадии окисления метанола и этанола у грызунов (мышь и крысы) и у человека. В графе АДГ1 для человека указаны минимальные значения для K_m

среди всех комбинаций субъединиц алкогольдегидрогеназ I класса. АДГ1 – алкогольдегидрогеназы I класса. Для человека указана K_m для β субъединицы АДГ1.

Организм	Каталаза		Цитохромоксидаза P450 2E1	АДГ1	
	Метанол	Этанол	Этанол	Метанол	Этанол
Грызуны	1,5	12	9	182-380	0,15-2,7
Человек	1500	6200	10	1,5-6	0,05

1.4. Окисление коротких альдегидов в организме млекопитающих

ФА, как и метанол, присутствует в биологических жидкостях и тканях здоровых млекопитающих в концентрации, не превышающей 0,1 мМ. Среди источников эндогенного ФА присутствуют деметилирование биополимеров (ДНК, РНК, белков), катаболизм серина, деаминация метиламина чувствительными к семикарбазиду аминоксидазами (SSAO) и окисление эндогенного метанола алкогольдегидрогеназами I класса, каталазой или цитохроксидазой P450 2E1. Из группы ферментов SSAO наиболее интенсивно изучается медь-содержащая аминоксидаза 3 (MCA3), закодированная геном AOC3 (Dunkel et al., 2008). Интересно, что антидепрессант фенелзин, ингибитор MCA3, увеличивает выживаемость культуры клеток астроцитов при добавлении ФА (Song et al., 2010).

Метаболизм одноуглеродных соединений при участии тетрагидрофолата

Несмотря на токсичность, ФА участвует в базовых метаболических процессах, включая синтез пуринов, аминокислот и тимидина (Kalhan, 2013). Одним из альтернативных окислению метанола источников ФА выступает реакция разложения серина до глицина, катаболизируемая сериновой гидроксиметилтрансферазой [EC 2.1.2.1]. Реакция сопряжена с присоединением ФА к тетрагидрофолату (ТГФ) и формированием N,N'-метилтен-ТГФ (Рисунок 1.7.) (Stover, 2009). В метаболизме одноуглеродных соединений ТГФ играет ключевую роль, выступая переносчиком одноуглеродных соединений и одним из путей окисления ФА и муравьиной кислоты до углекислого газа (Fox and Stover, 2008). ТГФ синтезируется в том числе через гидратацию фолиевой кислоты (витамин B9) в два этапа, катализируемых дигидрофолатредуктазой [EC

1.5.1.3], с промежуточным метаболитом в виде дигидрофолата. *De novo* синтез ТГФ происходит только у растений (Sahr et al., 2005) и бактерий, в связи с чем растительная пища и микрофлора кишечника выступают источниками ТГФ и его метаболитов для животных (Camilo et al., 1996). Таким образом, потенциально метаболизм ФА может быть нарушен при несбалансированной диете.

Образующийся в процессе разложения серина N,N'-метилен-ТГФ (альтернативное обозначение – 5,10-метилен-ТГФ) используется в качестве донора метильной группы тимидилатсинтазой (ТС) для реакции превращения урацила в тимидин (Costi et al., 2005), который далее окисляется до N,N'-метенил-ТГФ или восстанавливается до N-метил-ТГФ (Kalhan, 2013). Путем окисления N,N'-метенил-ТГФ образуется N'-формил-ТГФ, который используется для встраивания 2 и 8 углеродов в азотистое основание пуринов (Baggott and Tamura, 2015). Схема метаболизма ФА с участием ТГФ изображена на Рисунке 1.7. Восстановленный N,N'-метилен-ТГФ до N-метил-ТГФ метионинсинтаза использует в качестве кофактора в реакции превращения гомоцистеина в метионин, необходимый для метилирования биополимеров.

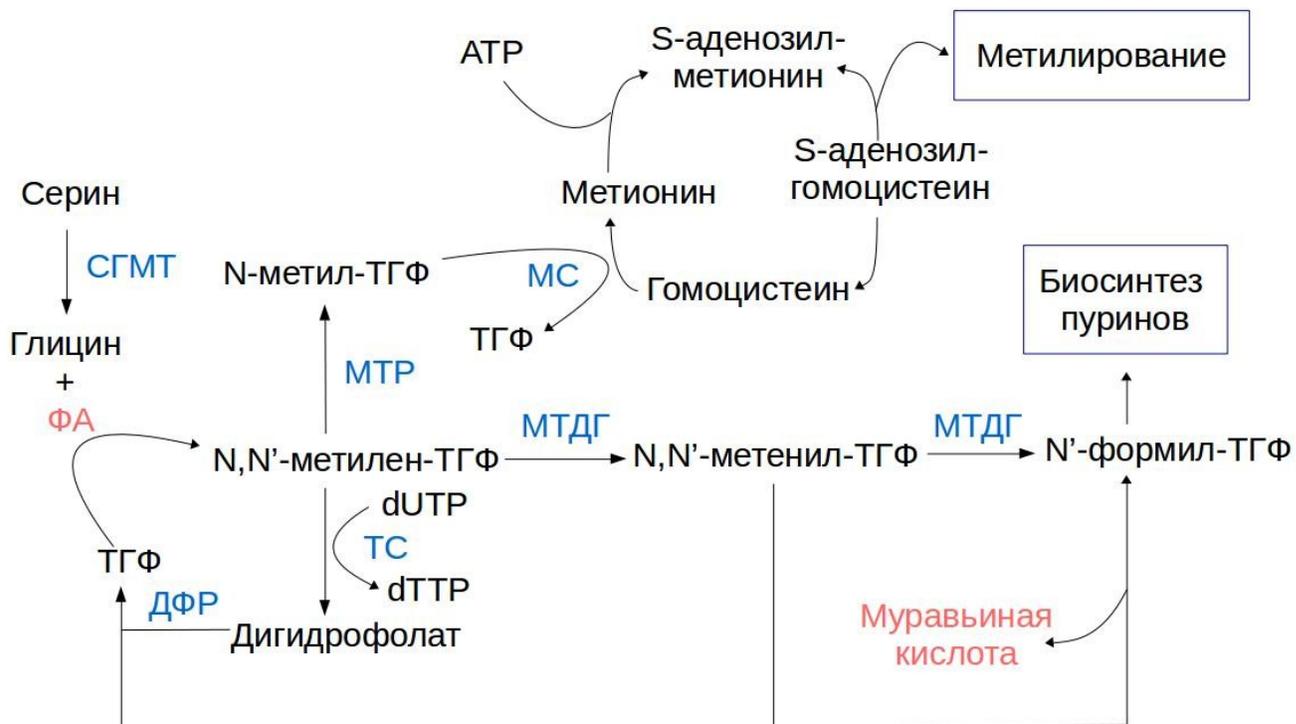


Рисунок 1.7. Схема метаболизма одноуглеродных соединений с участием тетрагидрофолата и его метаболитов. Оранжевым выделены одноуглеродные соединения, синим – ферменты, катализирующие соответствующие реакции, зеленым – важные участники реакций, черным – основные неоднууглеродные метаболиты. ФА – формальдегид, ТГФ – тетрагидрофолат, СГМТ – сериновая гидроксиметилтрансфераза, ДФР – дигидрофолатдегидрогеназа, ТС – тимидилатсинтаза, МТДГ – метилентетрагидрофолатдегидрогеназа, МТР – метилентетрагидрофолатредуктаза, МС – метионинсинтаза, ФТФДГ – формилтетрагидрофолатдегидрогеназа.

Алкогольдегидрогеназа III класса

Помимо катаболизма ФА через ТГФ, существует еще два пути его окисления. Один из них происходит в цитоплазме и осуществляется алкогольдегидрогеназой III класса (другое название формальдегиддегидрогеназа, ФДГ), кодируемой геном *ADH5*. Так как ФДГ не ингибируется 4-метилпиразолом, она была выделена в отдельный класс. Являясь самым эволюционно консервативным и широко представленным ферментом среди своего семейства, ФДГ, по-видимому, дала начало всем остальным алкогольдегидрогеназам путем дубликации генов (Danielsson and

Jörnvall, 1992). ФДГ отдает предпочтение длинным гидрофобным спиртам, среди которых 12-гидроксидедекановая кислота, фарнезол и ретинол (Molotkov et al., 2002; Moulis et al., 1991). Самая высокая аффинность (самая низкая K_m – 0,004 мМ) у ФДГ относительно гидроксиметилглутатиона (Moulis et al., 1991). Среди всех антиоксидантов у глутатиона самая высокая концентрация в клетке животных, и у человека колеблется в пределах 1,2-6,4 ммоль на кг ткани в зависимости от органа и клеточного компартмента (Evelson et al., 2001). Восстановленный глутатион связывает активные формы кислорода и углерода, включая ФА, предположительно в ходе спонтанной реакции (Ku and Billings, 1984). Образующийся S-гидроксиметилглутатион окисляется ФДГ до S-формилглутатиона (Thompson et al., 2010), который гидролизует S-формилглутатионгидролаза с образованием муравьиной кислоты и восстановленного глутатиона (Рисунок 1.8.) (Thompson et al., 2010)

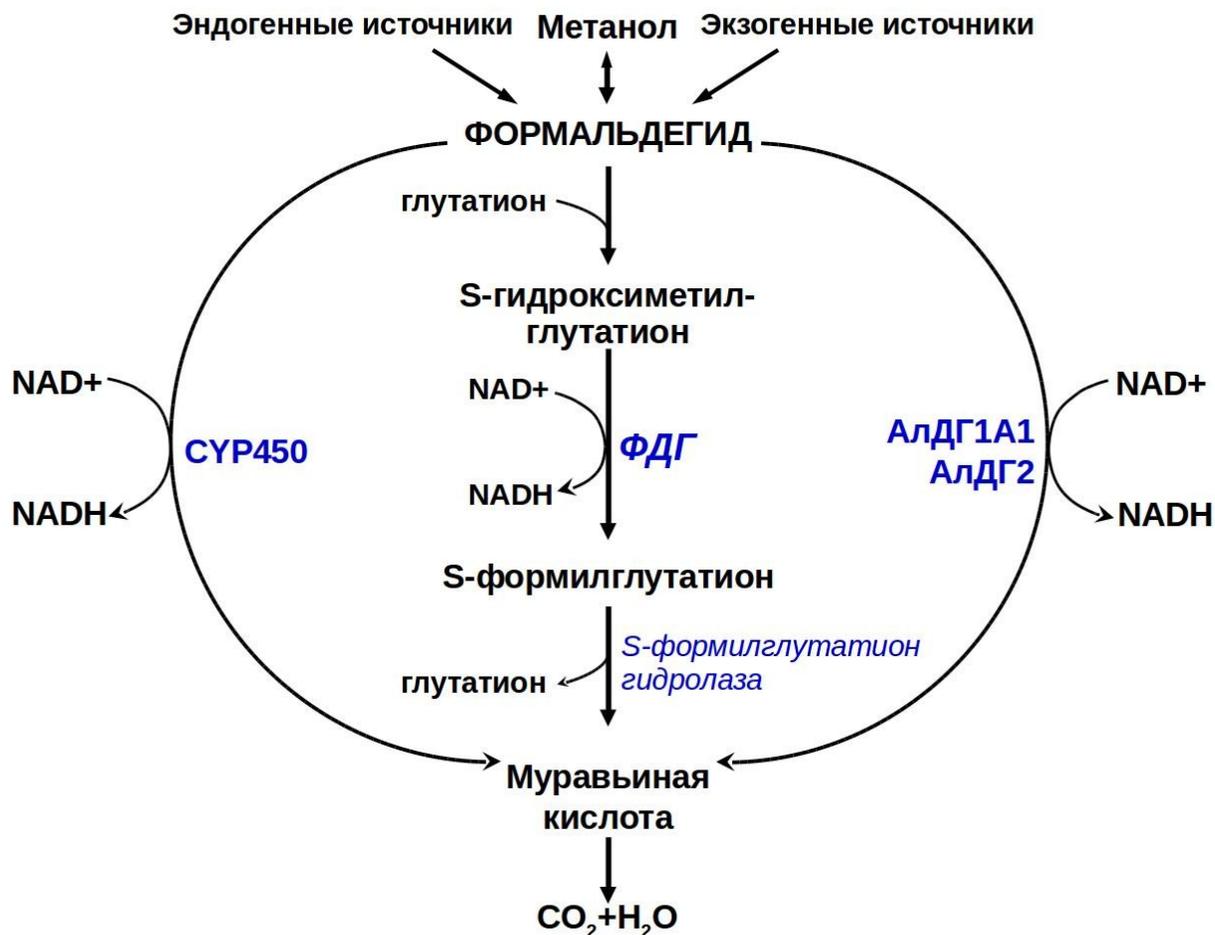


Рисунок 1.8. Схема метаболизма ФА у млекопитающих. CYP450 – цитохроксидазы P450, ФДГ – формальдегиддегидрогеназа, АлДГ1А1 и 2 – альдегиддегидрогеназы 1А1 и 2, соответственно.

Альдегиддегидрогеназа 2

В митохондриальном матриксе окисление ФА производит альдегиддегидрогеназа 2 (АлДГ2), кодируемая геном *ALDH2* (Sophos and Vasiliou, 2003). В отличие от остальных метаболических путей, АлДГ2 окисляет и ацетальдегид, и ФА. Она обладает низкой K_m к ацетальдегиду (0,6 мкМ), и более высокой K_m к ФА (0,2-0,5 мМ), чем у ФДГ (Mukerjee and Pietruszko, 1992). Таким образом, в митохондриях происходит пересечение второй стадии путей метаболизма этанола и метанола. Учитывая тот факт, что ФДГ и АлДГ2 находятся в разных

компартаментах клетки, каждая из них может вносить значительный вклад в окисление ФА, несмотря на разницу в несколько порядков в скорости окисления и аффинности связывания с ФА и, в случае ФДГ, его аддукта с глутатионом.

Цитохроксидазы P450

Как и в случае других альдегидов, цитохроксидазы P450 участвуют в окислении ФА, в частности, цитохроксидаза P450 2E1 обладает достаточно высокой аффинностью к ФА ($K_m = 1,1$ мМ), чтобы вносить вклад в его катаболизм у млекопитающих (Bell-Parikh and Guengerich, 1999; Liu et al., 2007).

Способность ФА легко проникать через мембраны и равномерно распределяться по компартаментам клетки, по-видимому, поспособствовала тому, что практически в каждом из них присутствует система для его детоксификации – ФДГ и ТГФ путь в цитоплазме, ФДГ в ядерном матриксе, АлДГ2 в митохондриальном матриксе и цитохроксидаза P450 2E1 в эндоплазматическом ретикулуме.

1.5. Фармацевтические регуляторы метаболизма метанола

Ингибиторы первой фазы метаболизма метанола и этанола

Первая фаза метаболизма метанола и этанола осуществляется через 3 пути: АДГ1, цитохроксидазу P450 2E1 и каталазу. Основной метаболизм у человека проходит через АДГ1, в связи с чем в клинической практике при отравлениях метанолом используется только ингибитор алкогольдегидрогеназ I класса – 4-метилпиразол (коммерческое название - фомепизол). Механизм ингибирования АДГ1 пиразолами основан на стабилизации комплекса НАДН с ферментом через взаимодействие с цинком активного центра АДГ1 и никотинамидным кольцом кофактора (Eklund et al., 1982; Shore and Gilleland, 1970). Долгое время эффект 4-метилпиразола на метаболизм коротких спиртов связывали исключительно с действием на АДГ1, однако было показано его ингибирующее действие на каталазу у мышей (Bradford et al., 1993a). 4-метилпиразол подавляет активность ацил-кофермент А-синтетазы в пероксисомах, которая активирует жирные кислоты, катализируя первую стадию их окисления. Деградация жирных кислот в пероксисомах происходит с образованием перекиси водорода, лимитирующей активность каталазы (Cederbaum, 2012b). Таким образом,

подавляя процесс поставки перекиси водорода, 4-метилпиразол снижает активность основного фермента, метаболизирующего этанол и метанол у грызунов (Bradford et al., 1993b).

Другим бифункциональным ингибитором окисления коротких спиртов служит ион азида. Он взаимодействует с трехвалентным железом, образующим комплексы с порфиринами в активном центре ферментов (Blumenthal and Kassner, 1979), в связи с чем азид ингибирует активность содержащих гем ферментов, к которым относятся каталаза и цитохромоксидаза.

Ингибиторы второй фазы метаболизма метанола и этанола

Вторая стадия окисления метанола и этанола катализируется в основном алкогольдегидрогеназой III класса и альдегиддегидрогеназой 2. Несмотря на гомологичность с АДГ1 и наличие цинка в активном центре, алкогольдегидрогеназа III класса не ингибируется пиразолом и его производными (Parés and Vallee, 1981).

Даидзин, относящийся к изофлованам и выделенный из Пуэрарьи Дольчатой (*Pueraria lobata*), ингибирует активность альдегиддегидрогеназы 2, что приводит к накоплению ацетальдегида и симптомам, наблюдаемым у людей с непереносимостью алкоголя (Keung and Vallee, 1993). Ингибирующая активность основана на его взаимодействии с гидрофобным карманом субстрат-связывающего центра фермента. Данное взаимодействие обратимо и характеризуется $IC_{50} = 80 \text{ nM}$ (Lowe et al., 2008).

К необратимым ингибиторам альдегиддегидрогеназы 2 относится дисульфирам, благодаря чему используется в клинической практике для лечения алкоголизма. Сульфидная группа дисульфирама образует дисульфидную связь с Cys302 в активном центре фермента, лишая его возможности окислять альдегиды (Lipsky et al., 2001; Shen et al., 2001).

Alda-1, активатор альдегиддегидрогеназы 2

Сравнительно недавно впервые была синтезирована группа активаторов алкогольдегидрогеназы 2, получившая название alda (Perez-Miller et al., 2010). Наиболее изученной является молекула alda-1. Она увеличивает активность альдегиддегидрогеназы 2 в два раза, при этом EC_{50} составляет 20 мкМ (Chen et al., 2008). Интересно, что alda-1 наравне с активацией альдегиддегидрогеназы 2 дикого типа, способна восстанавливать активность мутантной формы

E487K, широко распространенной у народов Восточной Азии. Согласно расшифрованной структуре взаимодействия *alda-1* с мутантной альдегиддегидрогеназой 2, она восстанавливает положение α -спирали и петли в районе активного центра фермента, тем самым приближая третичную структуру E487K к структуре фермента дикого типа (Perez-Miller et al., 2010). За счет восстановления структуры мутантного фермента, *alda-1*, увеличивает его активность относительно коротких альдегидов в 11 раз, что близко к значениям альдегиддегидрогеназы 2 дикого типа.

1.6. Участие этанола в регуляции экспрессии генов млекопитающих

Несмотря на то, что физиологический метанол был обнаружен в организме здоровых людей и модельных организмов более 40 лет назад, нет данных о его влиянии на молекулярно-биологические процессы клетки. Отсутствие интереса объясняется тем, что метанол считали метаболическим мусором, в связи с чем, не рассматривалось его участие в регуляции клеточных процессов. Исходя из очень похожих физико-химических свойств и путей метаболизма, логично предположить схожесть эффектов метанола и этанола на молекулярные процессы клетки, поэтому в этой части представлен краткий обзор литературы о влиянии этанола на экспрессию генов млекопитающих.

Активация экспрессии CYP2E1

Оценка влияния этанола на клетки млекопитающих в основном проводится в ходе хронического введения/употребления этанола. Было показано, что этанол активирует экспрессию гена *CYP2E1* в печени и мозге грызунов (Jin et al., 2013; Kim et al., 2013; Zhong et al., 2012). С увеличением активности цитохромоксидазы P450 2E1 повышается количество активных форм кислорода. Окислительный стресс провоцирует переход транскрипционного фактора NRF2 из цитоплазмы в ядро, где он активирует экспрессию огромного количества генов, включая другую цитохромоксидазу – *CYP2A5* (Lu et al., 2012). Первостепенную роль *CYP2E1* в активации экспрессии генов защиты клетки от окислительного стресса подтверждают данные по отмене эффекта на NRF2 и *CYP2A5*, но не *CYP2E1*, при введении антиоксидантов (Cederbaum, 2013, p. 2; Lu et al., 2012). Экспрессия остальных генов пути метаболизма спиртов (*ADH1*, *CAT*, *ALDH2* и *ALDH1*) не меняется в ответ на введение этанола (Chen et al., 2011).

Активация воспалительного ответа в мозге

Периодическое введение этанола крысам повышает уровень мРНК двух посредников воспалительных процессов – COX2 и iNOS, и способствует клеточной смерти в гиппокампе, мозжечке и новой коре головного мозга. Более того, в ответ на введение этанола у мышей и крыс повышается уровень мРНК и белка 3 и 4 Toll-подобных рецепторов (Pascual et al., 2014; Vetreno and Crews, 2012). Последние играют ключевую роль в воспалительных процессах у млекопитающих через активацию транскрипционного фактора Nf-kB, запускающего транскрипцию провоспалительных цитокинов. Например, хроническое употребление алкоголя увеличивает уровень провоспалительных цитокинов в мозге, что приводит к повреждению нервных клеток (Alfonso-Loeches et al., 2010). Выключение гена TLR4 убирает опосредованное этанолом воспаление, что указывает на ключевую роль TLR4 (Alfonso-Loeches et al., 2010).

Влияние на экспрессию генов рецепторов нейротрансмиттеров

Этанол способствует увеличению потока ионов хлора через рецепторы тормозного нейротрансмиттера гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), в связи с чем алкоголь способен оказывать седативный эффект на человека. Рецепторы ГАМК составляют пять субъединиц - трансмембранных белков, относящихся к классам α (у человека кодируются генами *GABRA1 - 6*), β (*GABRB1 - 4*), γ (*GABRG1 - 3*), δ (*GABRD*), ϵ (*GABRE*), π (*GABRP*) и θ (*GABRQ*). Эффект агонистов в значительной степени зависит от субъединичного состава рецепторов ГАМК, и самое сильное влияние этанол оказывает на ГАМК рецептор состава $\alpha_4\beta_2\delta$ (Sundstrom-Poromaa et al., 2002).

Помимо аллостерической регуляции, этанол активирует транскрипцию некоторых субъединиц ГАМК рецепторов. Хроническое употребление этанола повышает экспрессию *GABRA4*, в то же время снижает экспрессию *GABRA1* (Devaud et al., 1997, 1995). Механизм, лежащий в основе различий в регуляции транскрипции ГАМК рецепторов, остается неизвестен. Однако удалось обнаружить, что протеинкиназа A опосредует действие этанола на экспрессию ГАМК рецепторов (Davies, 2003).

Еще одной группой рецепторов мозга, участвующих в передаче импульса и связывающие этанол являются ионотропные рецепторы глутамата (ИРГ). В отличие от рецепторов ГАМК, они относятся к возбуждающим, так как формируют ионные каналы для Na^+ . ИРГ представляют собой

гетеротримеры, и сочетание субъединиц влияет на восприимчивость комплекса к его лигандам. Так, ингибирующее действие этанола проявляется сильнее всего в случае с комплексом NR1-2b/NR2C, и слабее всего у комплексов NR1-3b/NR2C, NR1-3b/NR2D и NR1-4b/NR2C (Acosta et al., 2010). Как и в случае с ГАМК рецепторами, этанол влияет на уровень мРНК некоторых субъединиц ИРГ. Например, в гиппокампе хронических алкоголиков уровень мРНК *GRIN2B* и *GRIN2D* значительно повышен по сравнению с контрольными образцами (Epoch et al., 2014). Более того, воздействие этанола эмбрионов мышей также приводит к увеличению уровня белка GRINB2 в гиппокампе, что указывает на участие этанола в регуляции ИРГ, по крайней мере, в данной области мозга (Kervern et al., 2015).

1.7. Патологические свойства формальдегида и метанола

Клинические случаи отравления метанолом характеризуются развитием ацидоза, провоцирующего острую почечную недостаточность и слепоту (Tephly, 1991). Смертельной дозой метанола считается 1 г/кг, при условии, что человек вместе с метанолом не употреблял этанол (Roe, 1955). Ключевую роль в развитии ацидоза при отравлении метанолом играет муравьиная кислота. Было показано, что ее метаболизм в значительной степени зависит от концентрации ТГФ в организме млекопитающего. При его снижении, в организме животных пропорционально увеличивается чувствительность к метанолу (Roe, 1955). Таким образом, уровень ТГФ важен для предсказания рисков в случае отравления метанолом и нарушения в его метаболизме могут сильно влиять на прогноз пациента.

Наравне со случаями отравлений метанолом, угрозой для качества и продолжительности жизни человека могут служить нарушения в метаболизме эндогенного метанола и ФА. В то время как метанол безвреден для культуры клеток млекопитающих (Kostic and Dart, 2003), ФА обладает генотоксичными и протеотоксичными свойствами (Ishikawa et al., 2007; Ortega-Atienza et al., 2016; Pontel et al., 2015). Инкубация лимфоцитов и гибридных клеточных культур млекопитающих с концентрациями ФА всего в 2-3 раза превышающими физиологические, значительно увеличивает частоту встречаемости микроядер за счет нарушения целостности хромосом (Speit et al., 2011). В здоровой клетке ДНК от связанных с ФА повреждений защищают белки репарационного пути

Фанкони. Нокаут основных участников этого пути увеличивает количество разрывов хроматид и количество радиальных хромосом в 3 раза (Rosado et al., 2011). Протеотоксичные свойства ФА выражаются в виде увеличения полиубиквитинированных белков по 48 лизину (метка, направляющая белок на протеолиз в протеасомы) и повышении экспрессии генов теплового шока HSP70 (Ortega-Atienza et al., 2016).

Исследование эффектов регулярного воздействия паров ФА на работу центральной нервной системы показало, что даже в умеренных концентрациях он способен проявлять нейротоксичные свойства. Механизм нейротоксичного действия ФА, вероятно, связан с увеличением окислительного стресса, вызванного снижением активности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы, а также повышением концентрации NO и малондиальдегида (Songur et al., 2008; Zararsiz et al., 2006).

Работы на модельных организмах и добровольцах также выявили связь между ФА и нейродегенеративными патологиями. За счет активной альдегидной группы, ФА легко связывается с амиогруппами, образуя основания Шиффа, что способствует образованию сшивок между и внутри молекул как *in vitro*, так и *in vivo* (Gubisne-Haberle et al., 2004; Lai et al., 2016; Lu et al., 2008; Metz et al., 2006). С возрастом наблюдается рост концентрации эндогенного ФА в крови и в гиппокампе млекопитающих, вплоть до 0,5 мМ (Tong et al., 2013). Более того, в крови у людей ФА накапливается возраст-зависимо и повышен в образцах тканей мозга пациентов с болезнью Альцгеймера (БА) (Tong et al., 2015). При старческой деменции уровень ФА коррелирует с ее стадией, что, учитывая его нейротоксичные свойства, может указывать на участие ФА в патогенезе заболевания (Tong et al., 2011). Среди потенциальных механизмов воздействия ФА при нейродегенеративных патологиях перечисляются нарушения в метилировании ДНК через ингибирование ДНК-метил трансфераз в гиппокампе, участие в формировании агрегатов таубелка и нарушение транскрипции (He et al., 2016; Lu et al., 2013; Nie et al., 2007; Tong et al., 2015). В связи со сниженным уровнем метилирования ДНК в тканях мозга при повышенном содержании ФА, предполагают, что нейродегенеративные свойства ФА могут быть обусловлены нарушением процессов метилирования.

Причиной возраст-зависимого увеличения содержания ФА, по-видимому, является нарушение его метаболизма. Семикарбазид-чувствительные аминоксидазы, образующие ФА в

реакции деаминации метиламина, в мозге млекопитающих присутствуют только в кровеносных сосудах, что является типичным местом накопления тау-агрегатов у пациентов с БА. Более того, иммуногистохимия образцов мозга пациентов с БА выявила значительное перекрытие в локализации семикарбазид-чувствительных аминоксидаз с амилоидными бляшками и ее активность в крови коррелирует со стадией БА (Unzeta et al., 2007).

1.8. Альфа-липоевая кислота как потенциальный регулятор метаболизма эндогенного метанола

Альфа-липоевая кислота (АЛК) встречается во всех царствах живых организмов, в основном, в связанной форме как кофактор для реакций переноса карбоксильных групп, но ее небольшая часть находится в свободной форме (Chuang et al., 1984; KOIKE et al., 1960; Nakano et al., 1991; Pares et al., 1994). Небольшая доля АЛК образует дисульфидные связи с сульфидными группами белков, но для функционирования в качестве кофактора она через карбоксильную группу формирует амидную связь с ϵ -NH₂ группой лизина (Рисунок 1.9.) (Nakano et al., 1991; Pares et al., 1994). Впервые АЛК в качестве кофактора была обнаружена у ферментов цикла Кребса - пируватдегидрогеназного и альфа-кетоглутаратдегидрогеназного комплексов. Позже АЛК была найдена в активном центре ферментативного комплекса дегидрогеназы альфа-кетокислот с разветвленной цепью (E2 субъединица, EC 2.3.1.168) (Harris et al., 2005), ацетоиндегидрогеназы (E2 субъединица, EC 2.3.1.190) (Xiao and Xu, 2007) и системы катаболизма глицина (L-белок, EC 1.8.1.4) (Kikuchi, 1973). Все ферменты представляют собой сложные белковые комплексы, состоящие из 3-4 типов субъединиц, и к одному комплексу обычно присоединено несколько молекул АЛК.

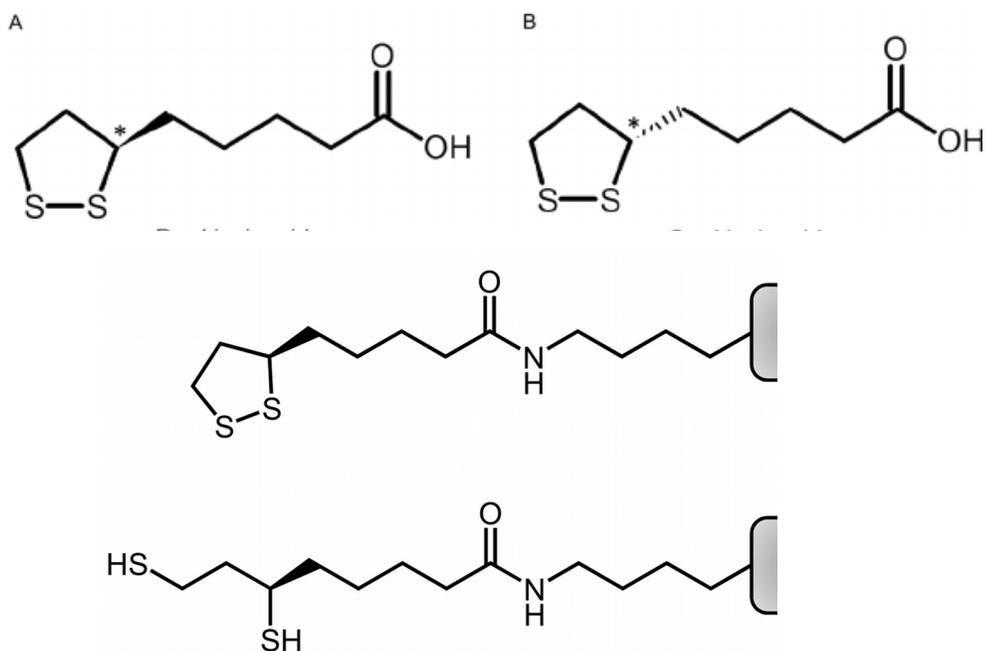


Рисунок 1.9. Окисленная альфа-липоевая кислота в свободной форме (на рисунке сверху – (A) R-форма АЛК, (B) S-форма АЛК), липоамид (окисленная форма, на рисунке посередине) и дигидролипоеамид (восстановленная форма, на рисунке первая снизу) с лизином. * хиральный центр.

АЛК синтезируется из альфа-кетокислот в организме млекопитающих. Благодаря длинному предельному углеродному остову и карбоксильной группе, она в небольших концентрациях растворима в воде и отлично растворяется в полярных и жирных растворителях, за счет чего АЛК проходит сквозь мембраны. рК кислоты примерно 4,5, то есть в цитоплазме и матриксе митохондрий карбоксильная группа АЛК депротонирована и молекула заряжена отрицательно.

Свойства АЛК как антиоксиданта

АЛК относится к эндогенным антиоксидантам, пара АЛК/дигидролипоевая кислота (ДГЛК) обладает окислительно-восстановительным потенциалом в -0,32 V, что значительно ниже, чем у пары окисленный/восстановленный глутатион (-0,24 V) (Kagan et al., 1992). Как АЛК, так и ДГЛК способны связывать активные формы кислорода, и за счет рядом расположенных сульфидных групп – хелатировать ионы металлов (Рисунок 1.10.) (Tibullo et al., 2017).



Рисунок 1.10. Схематическое изображение основных свойств альфа-липоевой кислоты как антиоксиданта. Окис. - окисленный, вост. - восстановленный.

Несмотря на способность АЛК в окисленной и восстановленной формах связывать активные формы кислорода, ее основной вклад в защиту от окислительного стресса заключается в восстановлении пула антиоксидантов, в частности, в увеличении концентрации восстановленного глутатиона (Bast and Haenen, 1988; C et al., 2016; Stanković et al., 2014). Глутатион играет ключевую роль в метаболизме ФА в цитоплазме клетки. Спонтанно связывая ФА, глутатион превращается в S-метилглутатион, один из главных субстратов алкогольдегидрогеназы III класса (подробнее см. Раздел 1.4). Таким образом, АЛК способна активировать окисление ФА через повышение концентрации восстановленной формы глутатиона в клетке.

С другой стороны, введение АЛК людям с ишемической болезнью сердца приводит к увеличению активности АлДГ2 (Li et al., 2013) – еще одного фермента, окисляющего ФА. Аналогичный эффект наблюдался в слизистой оболочке желудка крыс, которых поили этанолом (Li et al., 2016). Однако точный механизм активации АлДГ2 в присутствии АЛК оставался неясен. Инкубация ДГЛК с АлДГ2 в условиях окислительного стресса увеличивает его активность за счет восстановления цистеиновых остатков в активном центре фермента (Wenzel et al., 2007).

Способность ДГЛК в отличие от остальных антиоксидантов проходить в активный центр АлДГ2 согласно молекулярному моделированию подтверждает данную гипотезу (Munoz-Clares et al., 2017). С другой стороны, данные по *in vivo* активации АлДГ2, получены при введении окисленной формы АЛК.

Влияние АЛК на сигнальные каскады клетки

Эффекты АЛК в клетке опосредуются сигнальными путями Pi3k/AKT/NRF2 , NF-kB и mTOR (Bitar et al., 2010; Deng et al., 2013; Kamarudin et al., 2014; Lv et al., 2014; Shi et al., 2016). Взаимосвязь АЛК с метаболизмом глюкозы хорошо задокументирована, хотя точный механизм пока что неясен. Было показано, что АЛК стимулирует захват глюкозы в клетки адипоцитов и скелетных мышц (Konrad et al., 2001; Moini et al., 2002; Smith et al., 2004). Так, АЛК увеличивает количество фосфорилированного белка p38 MAPK и протеинкиназы B (AKT) , которые запускают транслокацию в плазматическую мембрану и наработку мРНК ключевых переносчиков глюкозы - GLUT4 и GLUT1 (Konrad et al., 2001; Moini et al., 2002). Метаболизм глюкозы тесно сопряжен с сигнальным каскадом mTOR , что, по-видимому, объясняет эффекты АЛК на данный сигнальный путь (Lv et al., 2014). Способность АЛК ингибировать NF-kB , вероятно, лежит в основе ее противовоспалительных эффектов. NF-kB является ключевым транскрипционным фактором в регуляции воспаления. При обычных условиях он связан с $\text{I}\kappa\text{B}$, ингибирующим его активность. При поступлении провоспалительного стимула, NF-kB освобождается из комплекса и уходит в ядро, где активирует экспрессию основных участников воспаления. АЛК ингибирует активность NF-kB за счет стабилизации его комплекса с $\text{I}\kappa\text{B}$ с привлечением MAPK (Bierhaus et al., 1997; Packer, 1998; Packer et al., 2001).

Транскрипционный фактор NRF2 , кодируемый геном NFE2L2 , считается основным сенсором окислительного стресса в клетке. Как и NF-kB , он постоянно присутствует в цитоплазме клетки в комплексе с Keap1 . В условиях окислительного стресса их комплекс разрушается, и NRF2 переходит в ядро, где регулирует экспрессию генов II фазы антиоксидантной защиты, среди которых SOD , NQO1 и CAT (Zhu et al., 2005). Хотя у человека каталаза, скорее всего, не участвует в метаболизме метанола, у грызунов она играет важнейшую роль. Таким образом, АЛК

потенциально способна активировать метаболизм метанола и ФА через увеличение активности каталазы у грызунов и АлДГ2 с ФДГ у млекопитающих.

Влияние АЛК на когнитивные способности пациентов с БА

На текущий момент закончено 2 клинических исследования касательно влияния АЛК на когнитивные возможности пациентов с нейродегенеративными заболеваниями (Fava et al., 2013; Shinto et al., 2014). В первом исследовании участвовало 43 пациента с БА, в терапию которых, помимо ингибиторов ацетилхолинэстеразы, была включена АЛК в дозировке 600 мг/сутки. По окончании 48-месячного исследования, пациенты проходили тесты краткой шкалы оценки психического состояния и шкалы оценки когнитивных функций при БА. У пациентов с начальной стадией деменции, принимавших АЛК вместе со стандартной терапией, наблюдались улучшения показателей обоих тестов по сравнению с контрольной группой (Fava et al., 2013).

Во втором, рандомизированном плацебо-контролируемом двойном слепом клиническом исследовании, было 39 пациентов с БА. Три группы пациентов получали омега-3-ненасыщенные кислоты, омега-3-ненасыщенные кислоты с АЛК (600 мг/сутки) или плацебо в течение 12 месяцев. Измерения уровня F2-изопростана в моче как маркера окислительного стресса не выявило его изменений ни в одной из групп пациентов. Когнитивные тесты шкалы оценки когнитивной функции при болезни Альцгеймера, краткой шкалы оценки психического состояния и функционального теста (шкала оценки способности к самообслуживанию) показали значимое замедление развития деменции (Shinto et al., 2014).

Таким образом, в предварительных исследованиях прием АЛК положительно сказывался на когнитивных способностях пациентов с БА. Вместе с данными о повышенной концентрации ФА в тканях мозга пациентов с БА и в связи с его нейротоксичными свойствами, положительное влияние АЛК на пациентов может быть обосновано ее способностью регулировать метаболизм ФА.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Эксперименты с животными

Все эксперименты с мышами проводились в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных, принятому и обнародованному Национальными институтами здравоохранения США, и были одобрены этической комиссией Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова (протоколы №2/12 от 6 февраля 2012 года и №4 от 12 мая 2016 года). Во всех экспериментах были использованы небеременные самки мышей линии Balb/c весом от 28 до 35 г или крысы линии Wistar. Использовался корм на основе зерновых культур, который состоял из 12,7% белка, 5,6% жира и 54,1% углеводов с общим содержанием волокон 3,7% с витаминно-минеральными добавками согласно рекомендации Американского института питания (диета AIN-93M). В виварии соблюдали световой режим 12/12. За 40 минут до начала эксперимента мышей переносили в помещение, где проводился эксперимент. Во время эксперимента у мышей убирали воду и корм. При необходимости эвтаназию проводили путем декапитации, все процедуры проводили быстро для минимизации болевых ощущений у животных.

1. Эксперимент с пектином. Мыши были случайным образом разделены на 5 групп по 10 мышей в каждой. У каждого животного из хвостовой вены собирали пробу крови объемом 100 мкл. Далее каждой группе перорально вводили 20 мг комплекса пектин/пектиинметилэстеразы, 20 мг пектина, 200 мкл 0.5% глюкозы или метанола (0.375 мкмоль/л). По истечению 10, 30, 60 и 120 минут мышей закрепляли, надрезали хвост и через хвостовую вену собирали по 100 мкл крови в 1,5 мл пробирки для последующего измерения концентрации метанола в сыворотке.

2. Эксперимент с 4-метилпиразолом. Мышей случайным образом распределяли на две группы по пять особей в каждой и внутривенно вводили по 350 мкл 4-метилпиразола (10

мг/кг) или физиологического раствора. По истечению 15, 30, 60, 90 и 120 минут мышей закрепляли, надрезали хвост и через хвостовую вену собирали по 100 мкл крови в 1,5 мл пробирки для последующего измерения концентрации метанола, этанола и ФА в сыворотке.

3. Эксперимент с печенью крыс. 10 крыс случайным образом распределяли на 2 группы. Одной группе в портальную вену ввели 1 мл 4-метилпиразола (10 мг/кг), разведенного в физиологическом растворе или 1 мл физиологического раствора в качестве контроля. Через 30 минут крыс эвтаназировали, вскрывали грудной отдел, отрезали кусочек печени весом 300 мг и гомогенизировали в 300 мл охлажденного буфера PBS в гомогенизаторе Поттера на льду. Клеточный дебрис отделяли центрифугированием (10 минут, максимальные обороты, +4°C), надосадочную жидкость переносили в новые охлажденные пробирки для последующего измерения концентрации метанола.

4. Перфузионная печень крыс. Анестезию осуществляли путем введения в брюшную полость препарата Zoletil 50 в дозировке 7,5 мг/кг веса. С целью системной гепаринизации в пенильную вену вводили гепарин в дозе 200 ЕД. Осуществляли срединную лапаротомию. С помощью канюли (Venflon 1,3x45 мм.) канюлировали воротную вену и в воротную вену дополнительно вводили 150 ЕД гепарина, после чего перевязывали подпеченочный отдел поллой вены. Отмывку печени от элементов крови осуществляли оксигенированным (95% O₂ и 5% CO₂) раствором Krebs-Хензиляйта (118 мМ NaCl, 4,5 мМ KCl, 2,75 мМ CaCl₂, 1,19 мМ KH₂PO₄, 1,18 мМ MgSO₄, 25 мМ NaHCO₃, pH 7.4) в объёме 500 мл при помощи перистальтического насоса, поддерживая объемную скорость перфузии в пределах 2,5-4 мл/мин/г. Это позволяло создавать перфузионное давление в воротной вене около 12-15 мм рт ст., что соответствует физиологическому давлению в воротной вене. Использовали рециркулирующую систему перфузии. Через отверстие, сделанное в плевральном отделе поллой вены, осуществляли отвод перфузата. После отмывки печени от элементов крови надпеченочный отдел поллой вены вместе с частью диафрагмы циркулярно высекали. Подпеченочный отдел поллой вены пересекали на уровне вены правого надпочечника. Далее пересекали чревный ствол и печеночно-пищеводные (гепатоезофагиальные) связки. Качество отмывания печени оценивалось по целостности органа,

равномерности бледной окраски и консистенции (степени отека). После отмывки печени от элементов крови в перфузат вводили 4-метилпиразол (10 мг/кг печени), метанол (120 мг/кг) или альфа-липоевую кислоту (20 мг/кг печени). Все манипуляции проводили в стерильных условиях с учетом требований асептики и антисептики. Пробы перфузата объемом 2 мл отбирали каждые 15 минут в течение 135 минут, по 2 пробы на каждую временную точку.

5. Резекция кишечника. Крыс породы Wistar случайным образом разделили на 2 группы по 5 животных в каждой. После вскрытия из яремной вены был отобран 1 мл крови и удалена часть желудочно-кишечного тракта (от пищевода). После чего был введен раствор 4-метилпиразола (10 мг/кг) объемом 1,5 мл. Прооперированных крыс держали под тепловыми лампами для поддержания постоянной температуры тела в пределах физиологических значений. Через час после операции из яремной вены снова отбирался 1 мл крови для измерения концентрации спиртов и ФА. В контрольной группе крысам не вырезали желудочно-кишечный тракт, остальные процедуры проводились так же.

6. Эксперимент с альфа-липоевой кислотой. Мышей случайным образом разделяли на 2 группы по 6 животных в каждой. С интервалом в 7 минут мышам внутрибрюшинно вводили 350 мкл раствора 4-метилпиразола (10 мг/кг) или 4-метилпиразола (10 мг/кг) с альфа-липоевой кислотой (20 мг/кг) в физиологическом растворе. Через 90 минут так же с интервалом в 7 минут мыши были эвтаназированы путем декапитации с последующим сбором образцов крови объемом 500 мкл. Сразу после декапитации на льду вскрывали черепную коробку и тело, и собирали образец целого головного мозга и печени. После изъятия, мозг и печень растирали в жидком азоте и из 50-100 мг ткани выделяли тотальную РНК реагентом Тризол согласно протоколу производителя. Для измерения ферментативной активности каждый мозг клали в индивидуальную стерильную пробирку на 15 мл с охлажденным PBS. Все процедуры с образцами ткани проводились на льду и охлажденными инструментами. Чтобы увеличить концентрацию фермента в пробе, образцы мозга группировали по два внутри контрольной и опытной групп.

Эксперименты с добровольцами

В экспериментах участвовали здоровые мужчины и женщины в возрасте от 18 до 70 лет. Добровольцы не имели хронических заболеваний (включая диабет), не являлись беременными или кормящими грудью на момент проведения эксперимента, не употребляли алкоголь за 12 часов до начала эксперимента и не курили за 30 минут и во время эксперимента. Протоколы проведения экспериментов с пектином, алкоголем и вином были одобрены комиссией по биоэтике Российского онкологического научного центра им. Н. Н. Блохина (протокол №2 от 20.09.2011), экспериментов с АЛК – комиссией по биоэтике Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (протокол № 70-о от 10.02.2017). Каждый из участников подписал информированное согласие. Забор крови производился натошак стерильным шприцом через канюлю: 2 мл для измерений на хроматографе и 5 мл для отделения лейкоцитов.

Подготовка образцов для хроматографии

Отобранный образец крови оставляли при комнатной температуре, до ее полного сворачивания. Все действия с кровью после ее сворачивания проводились в холодной комнате. Оборудование (пипетки, центрифуги, носики для отбора проб) предварительно охлаждалось. Центрифугированием образцов на 1200 об/мин в течение 10 минут (4° С) отделяли сыворотку, 100 мкл которой переносили в новые охлаждённые 1,5 мл пробирки. В случае следов гемолиза образец исключали из дальнейшего анализа. К аликвоте сыворотки в 100 мкл добавляли 100 мкл 100% ацетонитрила с 1% Triton X-100 или 10% раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Пробирки взбалтывали до образования хлопьев и оставляли во льду на 20 минут. Белки высаживали центрифугированием на 13200 об/мин в течение 10 минут, надосадочную жидкость переносили в новые охлажденные пробирки и хранили до начала измерений при -20°С. В случае выпадения осадка проводилось повторное центрифугирование при комнатной температуре до полного его удаления.

Измерение концентрации спиртов методом газовой хроматографии

Параметры хроматографического разделения были подобраны исходя из свойств разделяемых компонентов. Измерения проводили с помощью газового хроматографа Кристалл

5000.2 с пламенно-иононизирующим детектором, компрессора воздуха и генератора водорода (все Хроматэк, Россия), в качестве газа-носителя использовали азот (ОСЧ). Хроматографическое разделение было выполнено на капиллярной колонке SGE SOLGEL-WAX™ (I.D. 0.25 мм, длина 30 м, толщина 0.25 мкм) с неподвижной полярной фазой из полиэтилен-гликоля в матрице золь-геля. Для анализа были подобраны следующие условия: расход воздуха 200 мл/мин, расход водорода 20 мл/мин, расход азота 20 мл/мин, температура 220 °С. Термостат колонок была запрограммирован на температуру 40 °С в течение 1 мин с последующим нагреванием при скорости 20 °С/мин до 100 °С, которая выдерживалась в течение 2 мин, и последующим нагреванием при скорости 20 °С/мин до 200 °С, которая выдерживалась в течение 5 мин. Колонка: деление потока 100,7, давление (Азот) 70 кПа, поток (Азот) 0,892 мл/мин, 0 мин, скорость (Азот) 23,56 см/сек. Образец вводили шприцом (Хроматэк, Россия) в объеме 1 мкл. Общее время анализа составляло 15 минут. Времена удержания метанола и этанола составляли 3,45 и 3,73 минут, соответственно (Рисунок 2.1.). Шприц перед отбором пробы охлаждали. Перед началом измерений проводилось 2 анализа чистого 100% ацетонитрила или 10% ТХУ. Между анализами инжектор промывался MQ. Расчет производили на основании калибровочных кривых (Рисунок 2.2.).

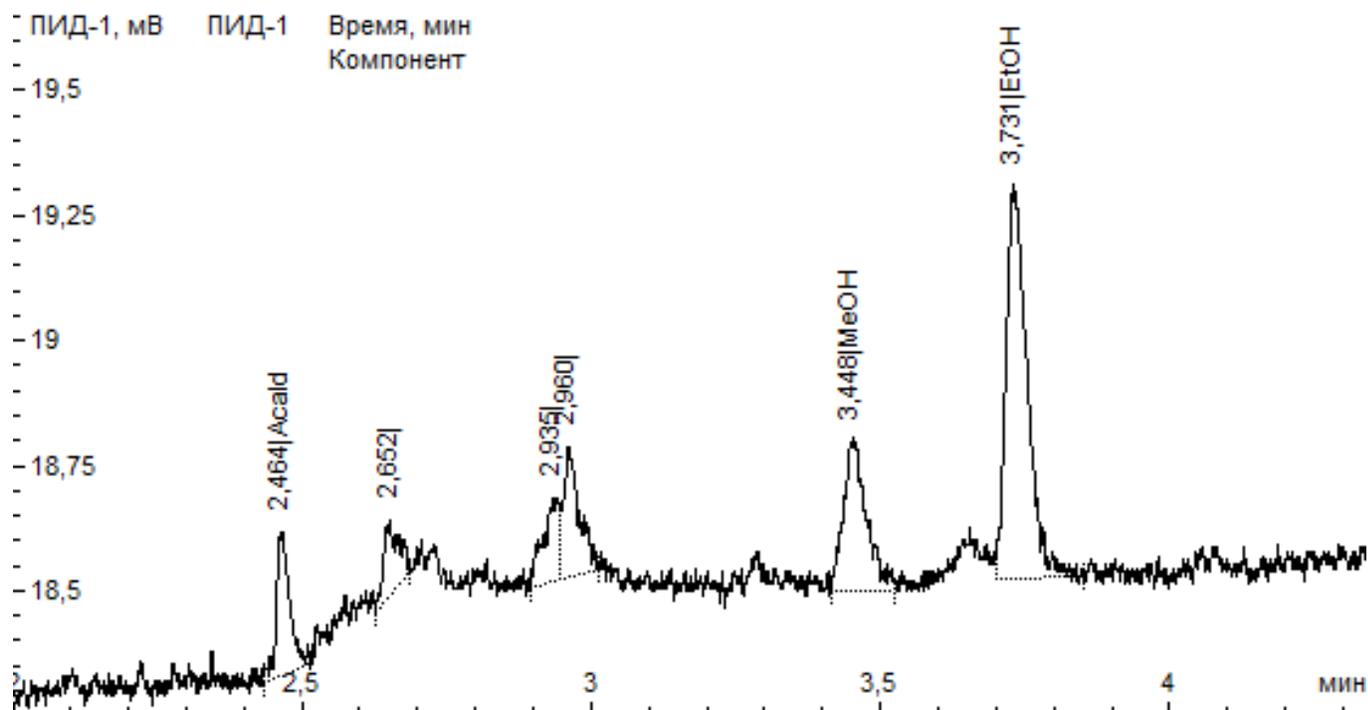


Рисунок 2.1. Пример хроматограммы, полученной методом газовой хроматографии с пламенно-ионоизирующим детектором при анализе образца сыворотки человека, очищенной от белков.

MeOH – метанол, EtOH – этанол.

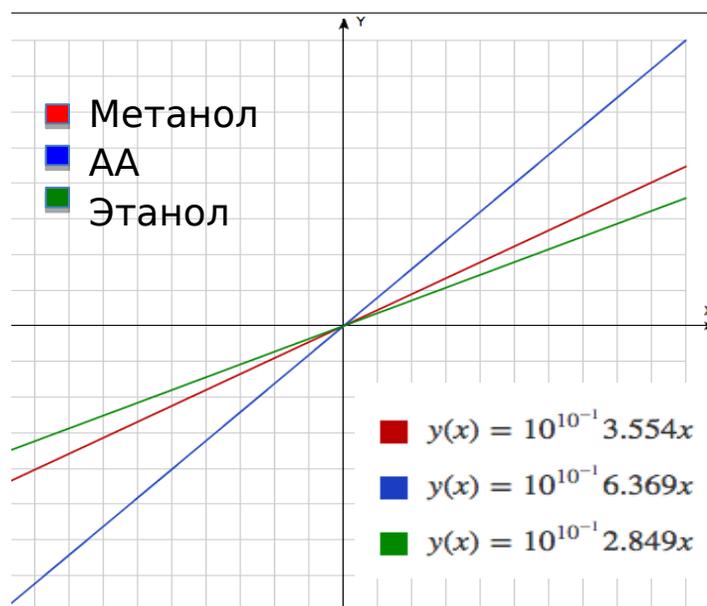


Рисунок 2.2. Градуировочные графики для метанола, этанола и АА, полученные на газовом хроматографе с пламенно-ионоизирующим детектором. На графиках представлена

зависимость значений отклика прибора в мВ (ось ординат) от концентрации веществ в мкМ (ось абсцисс). АА — ацетальдегид.

Измерение концентрации формальдегида методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

Анализ проводили на Dionex Ultimate 3000, состоящего из четырехканального градиентного насоса, дегазатора подвижной фазы, автоматического инжектора совмещенного с термостатом колонок, спектрофотометрического детектора с изменяемой длиной волны детектирования. Использовалась хроматографическая колонка Synergi Hydro-RP, 250×4.6 мм, диаметр зерна сорбента 4 мкм (пористость 80 Å) с предколонкой Security Guard (картридж с сорбентом C18, диаметр 3 мм) (производитель Phenomenex, США). Неподвижная фаза представляла собой силикагель с привитыми группами C18 с полярным эндкеппингом. Подвижная фаза: смесь деионизованной воды и ацетонитрила в соотношении 50/50 по объему.

Скорость потока подвижной фазы составляла 1 мл/мин, термостатирование колонки при 30 °С, объем вводимой пробы 20 мкл с предварительной промывкой инжектора смесью ацетонитрила и воды (50/50) и пробой. Общее время анализа составляло 20 минут. Детектирование производили спектрофотометрически в проточной ячейке при 360 нм. Время удерживания производного составляло $8,7 \pm 0,1$ мин. Определение ФА основано на его взаимодействии с избытком 2,4-динитрофенилгидразина в кислой среде с образованием соответствующего окрашенного продукта-гидразона, который хроматографически разделяется от остальных компонентов раствора.

Раствора для дериватизации готовили путем смешивания 20 мл чистого ацетонитрила, 100 мкл 85%-ой фосфорной кислоты (~0.5% в растворе) и 20 мг 2,4-динитрофенилгидразина гидрохлорида (~0,1% в растворе). Для приготовления холостого раствора к 0,5 мл деионизованной воды добавляли 0,5 мл раствора реагента и перемешивали. Образцы на измерение готовили, смешивая 450 мкл деионизованной воды, 50 мкл исследуемого образца и 0,5 мл раствора реагента, после чего перемешивали.

Дериватизацию проводили при комнатной температуре (22-24 °С) в течение 20 минут, по окончании раствор вводили в хроматограф. Для количественного анализа использовали

актуальную градуировочную зависимость по ФА, построенную с применением серии растворов, приготовленных из аналитического стандарта 2,4-динитрофенилгидразона. Уравнение градуировочной зависимости: S (площадь пика, усл. ед) = $14,36 \times c$ (концентрация ФА, мг/л). При расчете учитывали результат холостого опыта, формула для расчета содержания в образцах: C (мг/л) = $(S_x - S_{blank}) / 14,36 * 20$, где 14,36 – градуировочный коэффициент, 20 – коэффициент разбавления.

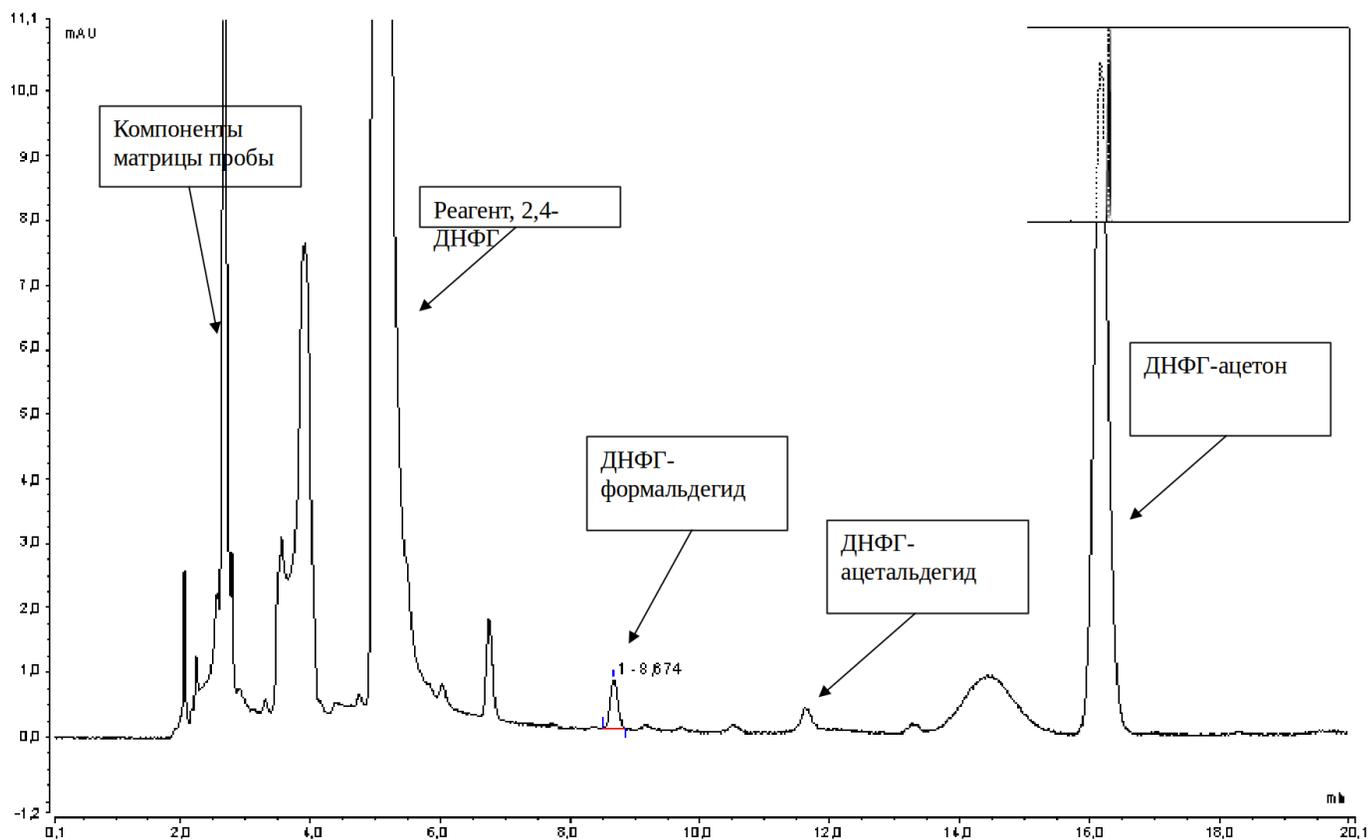


Рисунок 2.3. Пример хроматограммы, полученной методом высокоэффективной жидкостной хроматографии при анализе сыворотки крови человека, очищенной от белков и прошедшей реакцию дериватизации.

Выделение лейкоцитов

Выделение лейкоцитов производили из 5 мл крови добровольцев. Сразу после отбора, кровь помещали в охлажденные 50 мл пробирки, содержащие 300 мкл 0,5 М EDTA, хорошо перемешивали и оставляли во льду до момента выделения (в среднем 30-60 минут). К 5 мл крови

добавляли 20 мл охлажденного буфера для лизиса эритроцитов (10 mM KHCO_3 , 0,15 M NH_4Cl , 0,1 mM EDTA) и оставляли при комнатной температуре на 10-15 минут до полного лизиса эритроцитарной фракции. Лейкоциты осаждали центрифугированием на скорости 1000 об/мин в течение 10 минут при +4 °C. Надосадочную жидкость аккуратно сливали, ресуспензировали осадок в 1 мл охлажденного PBS и переносили в чистые 1,5 мл пробирки. Лейкоциты отмывали от эритроцитов в охлажденном PBS до полного исчезновения красного оттенка в надосадочной жидкости (2-4 раза). После отмывки к лейкоцитам добавляли 1 мл Тризола и выделяли РНК.

Выделение РНК

В случае образцов тканей, сразу после изъятия замораживали и растирали в жидком азоте. Растертый материал (50-100 мг) переносили в 1-1,5 мл Тризола. После пипетирования пробирки помещали на ротатор и инкубировали в течение 20-40 минут до полного лизиса образца. К раствору добавляли хлороформ из расчета 200 мкл на 1 мл Тризола, интенсивно перемешивали и центрифугировали на скорости 13200 об/мин 10 минут при 4 °C. Водную фазу переносили в новые чистые 1,5 мл пробирки, добавляли равный объем изопропанола, перемешивали и центрифугировали на скорости 13200 об/мин в течение 10 минут при 4 °C. Осадок промывали в 400 мкл охлажденного 70% этанола, после чего сушили и растворяли в 200 мкл MQ. К раствору РНК добавляли равный раствор 4 M LiCl, перемешивали и оставляли на ночь во льду при 4 °C. РНК осаждали центрифугированием на скорости 13200 об/мин в течение 20 минут при 4 °C, осадок промывали охлажденным 70% этанолом, сушили и ресуспензировали в MQ. К раствору РНК добавляли 1/10 объема 3 M ацетата натрия (pH 3.2) и 5 объемов охлажденного 96% этанола, перемешивали и инкубировали при -70 °C от 30 минут до нескольких суток. РНК осаждали центрифугированием на скорости 13200 об/мин в течение 20 минут при 4 °C. Отмывали от следов солей в 400 мкл охлажденного 70% этанола, сушили в течение 10-15 минут и ресуспензировали в 15-200 мкл MQ до конечной концентрации 500-1000 мкг/мл. Качество выделения и количество РНК оценивали на Nanodrop по соотношениям A260/230 и A260/280.

Анализ тотальной РНК из мозга мышей на микроматрицах

В ходе каждого эксперимента мыши линии BALB/c были случайным образом распределены в группы по 5 в каждой. Мышам внутрибрюшинно вводили метанол (0,12 г/кг), 4-МП (10 мг/кг) или физиологический раствор в качестве контроля, через 2 часа мышей эвтаназировали путем декапитации и собирали образцы крови для определения концентрации метанола и образцы целого мозга. Ингаляция парами метанола проводилась в контейнере объемом 5 литров с потоком воздуха 150 литров/час, проходящим через испаритель, содержащий вату, смоченную в 200 мкл метанола или в 200 мкл воды в контрольной группе. Через час мышей эвтаназировали путем декапитации и собирали образцы ткани целого мозга. Сразу после изъятия мозг замораживали и растирали в жидком азоте. Растертый материал переносили в 1-1,5 мл Тризола, после чего выделяли РНК. После пипетирования, пробирки помещали на ротатор и инкубировали в течение 20-40 минут до полного лизиса образца. После выделения, тотальная РНК дополнительно очищалась и концентрировалась с использованием RNeasy MinElute Kit, после чего подготавливались библиотеки с использованием Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit. Транскриптом мозга был проанализирован на Illumina MouseRef-6 BeadChip микроматрицах, содержащих 45200 специфических олигонуклеотидных проб. Сканирование матрицы производилось на Illumina BeadArray Reader с применением программного обеспечения BeadScan. Квантильную нормализацию сырых данных и определение дифференциально экспрессирующихся генов производили в программе JexpressPro 2012. Дифференциально экспрессирующимися считались транскрипты с изменением интенсивности сигнала в 1,3 раза по сравнению с контролем и $q\text{-value} < 0,05$. Анотацию дифференциально экспрессирующихся генов проводили в базе данных DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>), используя параметры по умолчанию. Диаграммы Венна строили в RStudio функцией `draw.triple.venn` пакета `VennDiagram`.

кОТ-ПЦР

Концентрацию РНК определяли на капиллярном спектрофотометре Nanodrop ND-1000. Значения соотношения 260:280 всех образцов были в пределах 1.9-2.1. Библиотеки кДНК были получены путем отжига 2 мг денатурированной тотальной РНК с 0.1 мг случайных гексамеров и 0.1 мг олиго-dT. Реакционная смесь инкубировалась с 200 units обратной транскриптазы

Superscript II 50 минут при 43°C. кОТ-ПЦР проводилась на приборе iCycler iQ с добавлением EVA Green согласно протоколу производителя. Программа ПЦР включала шаг денатурации в течение 3 минут при 95°C и 45 циклов, каждый из которых включал стадию денатурации при 95°C в течение 15 секунд, отжига – 30 сек при температуре отжига праймеров (Таблица 2.1.) и элонгации – 30 секунд при 72°C. По окончании амплификации снимались кривые плавления в диапазоне температур от 50°C до 95°C с целью определения специфичности реакции. Для каждого образца проводилось 3 технических повтора и контроль без добавления кДНК.

Таблица 2.1. Список олигонуклеотидов, использовавшихся для кОТ-ПЦР. Последовательность всех праймеров указана от 5'- к 3'-концу. T_a – температура плавления праймеров (от annealing temperature), п.н. - пар нуклеотидов.

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Размер ПЦР-продукта, п.н.	T_a , °C
mRPL32	GGCACCAGTCAGAC CGATATG	CCTTCTCCGCACCCTGT TG	80	56.0
mADH1	GTACCGTCCTGACTT TCTG	AAGATTAAGGCTGTGAT GTGG	106	52.2
mALDH1	GAAGAAAGAAGGA GCCAAAC	CGCATCTCATCAGTCAC G	102	53.3
mALDH2	GACGCCGTCAGCAG GAAAA	CGCCAATCGGTACAACA GC	189	62.9
mAPOE	AGTGGGCAAACCTG ATGG	ACCTGGCTGGATATGGA TG	127	53.9
mCPLX2	CGGGATGGGAGTGG GAAG	AAGGAAGCAGAGCAAC AAGG	111	55.4
mCYP2D22	TGCTGCTCCTCACA ACTC	AACACTTCTCAATCCTA ACTCC	173	55.9
mCYP2E1	GAAGAAATTGACAG GGTTATTGG	GGAAGGGACGAGGTTG ATG	118	55.6
mFIBCD1	GTAGGTGGGAGTGT CATC	TAGAAGTGCTGGTTGTG G	133	55.5

mGSTO1	ACGCTGATGGTCCT GAAG	GTGATGACAGATTCGGT GAC	155	55.1
mGSTP1	TGCCACCATACACCA TTG	TAACCACCTCCTCCTTCC	102	54.6
mMGST3	ACGGTGGGAGGTGT TTAC	CAAAGAGGGCAAGAGA GC	145	58.1
mNDUFB6	GAGCGATTCTGGGA TAAC	TGACATAATAGTGAACA AACC	130	51.7
mNDUFC2	GAGGTTGCTAAGGC TGAG	TTCCACGAGAGGTTTGA C	186	55.8
mRUSC2	GGAAGGAGGGGAG GAACAC	TGACGACCAGACTATTT ACAGC	153	56.3
mSERPINA3H	CCATCTCCACCGACT ACAG	ACATCCAGCACAGCCTT G	145	55.4
mSNCA	CTATGAGCCTGAAG CCTAAGAATG	GATGGAAGACTTTGAAA CACACTG	147	54.4
mSRXN1	TCCACATCAGCACC ACTACC	GGCACCAAGAGGCAGA CC	114	55.4
mTESK1	CCTCCCCTGACCCAT CTC	TGACCTGCTGCTTGCTT G	124	53.4
mCAT	TCAGGTTTCTTTCTT GTTCAG	TGGTCGGTCTTGTAATG G	138	52.4
mADH5	ACTTCATGGGGACT AGCACAT	AGAAGGCAGACTTTATC CAAAGG	100	60
mNRF2	AGGAGAGGTAAGAA TAAAGTC	CAAGATACAAGGTGCTG AG	181	52.6

Получение цитоплазматической и митохондриальной фракций белков мозга

Сразу после изоляции образцы мозга мышей помещали в пробирки с охлажденным PBS и хранили на льду. Перед началом гомогенизации образцы взвешивали и добавляли к каждому охлажденный буфер 1 (Таблица 2.2.) из расчета 20 мл на 1 г ткани. Образцы гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера с помощью электрического привода на скорости 800 об/мин в течение 5-10

минут. Гомогенат переносили в центрифужные стаканы и осаждали ядра и обломки клеток на скорости 1330 g в течение 10 минут при 4° С (Таблица 2.4.). Митохондрии осаждали центрифугированием надосадочной жидкости на скорости 18514 g в течение 15 минут при 4° С. Полученную надосадочную жидкость (включающую цитоплазматические белки) переносили в новые пробирки, добавляли 100X Halt коктейль ингибиторов протеаз и хранили на льду до начала измерений. Осадок митохондрий повторно промывали в буфере 1 (15 мл на 1 г ткани), после чего надосадочную жидкость сливали и ресуспензировали осадок в 1 мл буфера 2 (Таблица 2.3.), переносили в новые пробирки и добавляли коктейль ингибиторов протеаз. Суспензию митохондрий обрабатывали ультразвуком по 7 циклов (60 сек/60 сек). Митохондриальный дебрис осаждали центрифугированием на скорости 40000 g в течение 40 минут при 4° С. Надосадочную жидкость переносили в новые пробирки и в ней измеряли активность альдегиддегидрогеназы 2.

Таблица 2.2. Состав буфера 1.

Компонент буфера	Конечная концентрация
Сахароза	0,32 М
ЭГТА	0,5 мМ
ЭДТА	0,5 мМ
Трис-НСl рН 7,4	10 мМ

Таблица 2.3. Состав буфера 2.

Компонент буфера	Конечная концентрация
Калий-фосфатный буфер	0,1 М
ДТТ	1 мМ
MgCl ₂	13 мМ
CaCl ₂	1 мМ
ТРР	1 мМ
Глицерол	25%

Таблица 2.4. Центрифугирования для выделений митохондрий

№ центрифугирования	Цель	Об/мин (g)	Время, мин	Температура, °С
1	Осаждение ядер, обломков клеток	3000 (1330)	10	4±4
2	Осаждение митохондрий	12000 (18514)	15	4±4
3	Повторное осаждение митохондрий	12000 (18514)	15.	4±4

Измерение активности альдегиддегидрогеназы 2

Все измерения проводили на 96-луночном планшете спектрофотометрически. Активность рассчитывалась исходя из скорости накопления НАДН, которую оценивали при длине волны 340 нм во фракции митохондриальных белков мозга мышей с ФА в качестве субстрата. На плашку из темного пластика с прозрачным дном наносили по 20 мкл фракции митохондриальных белков в двух повторностях – для измерения активности фермента и для оценки фоновых реакций. Для измерения скорости работы альдегиддегидрогеназы 2 к белковой фракции многоканальной пипеткой добавляли НАД⁺ до конечной концентрации 0,1 мМ, ФА до конечной концентрации 0,2% и натрий-пирофосфатный буфер рН 8.1 до 200 мкл (Таблица 2.6.). В реакционную смесь для измерения фоновых реакций не добавляли ФА. Сразу после нанесения, растворы перемешивали пипетированием многоканальной пипеткой и начинали измерения при длине волны 340 нм на планшетном спектрофотометре при следующих параметрах: 5 секунд перемешиваний перед началом измерений, измерение оптической плотности каждые 8 секунд в течение 20 минут и 2 сек перемешиваний между измерениями. Основную и фоновые реакции снимали параллельно при 25 °С.

Измерение активности формальдегиддегидрогеназы

Активность оценивалась исходя из скорости накопления НАДН при длине волны 340 нм во фракции цитоплазматических белков мозга мышей с ФА и восстановленным глутатионом в качестве субстратов.

Измерение активности глутатион-зависимой формальдегиддегидрогеназы (ФДГ) во фракции цитоплазматических белков гомогенатов мозга мышей проводилось согласно схеме, представленной на Рисунке 2.4.

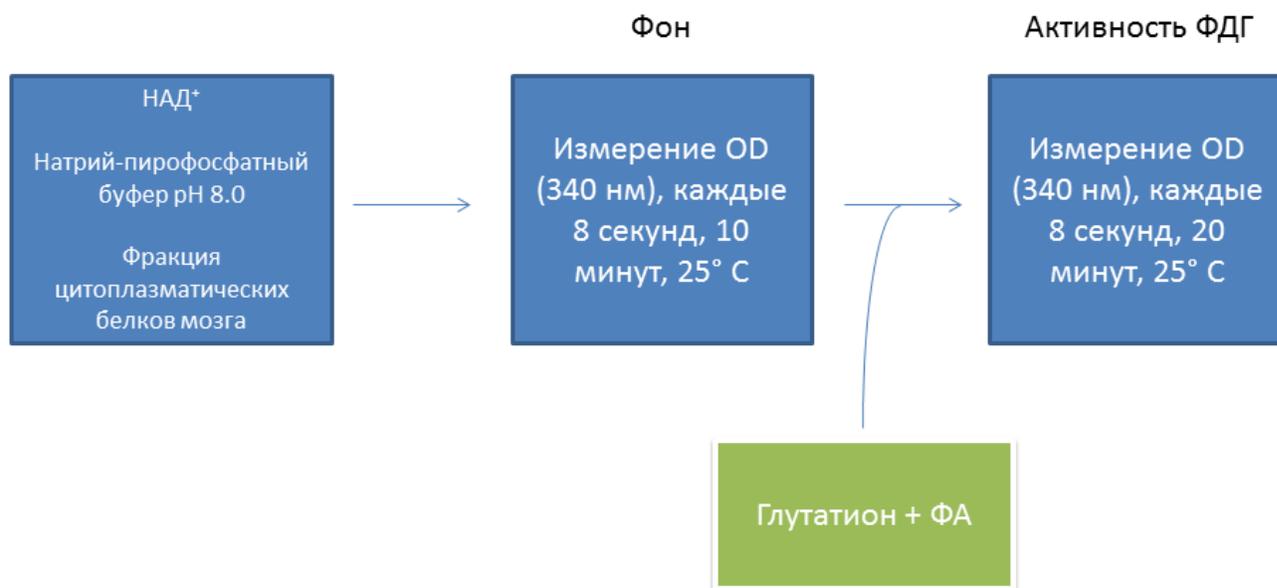


Рисунок 2.4. Схема эксперимента по измерению активности формальдегиддегидрогеназы, ФА – формальдегид. OD – оптическая плотность, ФДГ - формальдегиддегидрогеназа.

От образцов целого мозга 12 мышей по протоколу получали 6 фракций цитоплазматических белков (объединили по 2 мозга в один образец) и измеряли активность ФДГ, исходя из накопления НАДН, в каждой из фракций индивидуально в 96-луночной плашке из темного пластика.

На реакционную смесь сначала брали цитоплазматическую фракцию, буфер и НАД⁺ в соотношениях, указанных в Таблице 2.5. Далее 10 минут измеряли фоновые реакции до выхода графика на плато на 340 нм при 25° С. Затем добавляли в реакционную смесь глутатион и ФА в

эквимольном соотношении до конечной концентрации 1 мМ. И измеряли активность 20 минут на 340 нм при 25° С.

Таблица 2.5. Состав реакционной смеси для измерения активности ФДГ в цитоплазматической фракции гомогенатов мозга мышей. НАД – никотинамиддинуклеотид.

Компонент смеси	Начальная концентрация	Конечная концентрация	Объем исходного раствора для смеси
Фракция цитоплазматических белков			20 мкл
НАД ⁺	48 мМ	1,2 мМ	5 мкл
Натрий-пирофосфатный буфер рН 8,0	50 мМ	41,25 мМ	165мкл
Начало реакции			
глутатион	40 мМ	1 мМ	5 мкл
ФА	40 мМ	1 мМ	5 мкл

Измерение активности альдегиддегидрогеназы 2 (АлДГ2) в митохондриальном экстракте гомогенатов мозга мышей.

От образцов целого мозга 12 мышей согласно протоколу отделили 6 фракций митохондриальных белков (объединили по 2 мозга на образец на стадии гомогенизации) и измерили активность АлДГ2, исходя из накопления НАДН, в 96-луночной плашке из темного пластика с прозрачным дном. Схема наблюдаемой реакции представлена на Рисунке 2.5.



Рисунок 2.5. Схема эксперимента по измерению активности АлДГ2 в митохондриальном экстракте. OD – оптическая плотность, НАД – никотинамиддинуклеотид, АлДГ2 – альдегиддегидрогеназа 2.

В этом эксперименте параллельно измерялись фоновые реакции, когда в реакционной смеси были митохондриальный экстракт, буфер и НАД⁺ (Таблице 2.6.), и основная реакция, в которую был добавлен ФА. Схема данного эксперимента представлена на Рисунке 2.5..

Таблица 2.6. Состав реакционной смеси для измерения активности АлДГ2 в митохондриальной фракции гомогенатов мозга мышей. НАД – никотинамиддинуклеотид, ФА – формальдегид, НАД – никотинамидадениндинуклеотид.

Компонент смеси	Начальная концентрация	Конечная концентрация	Объем исходного раствора для смеси
Фракция митохондриальных белков			20 мкл
НАД ⁺	5 мМ	0,1 мМ	4 мкл

Натрий-пирофосфатный буфер pH 8,1	50 мМ	41,5 мМ	166 мкл
ФА	3,8%	0,19%	10 мкл

Расчет активности ферментов

Для расчета активности ферментов была использована следующая формула:

$$U / \text{мг (белка)} = (\Delta D * V) / (\epsilon * 0,67 * C \text{ (белка, мг/мл)})$$

где ΔD – изменение оптической плотности в минуту для линейного участка, ϵ – коэффициент молярной экстинкции для НАДН равный $6,22 \text{ мМ}^{-1} * \text{см}^{-1}$, 0,67 – оптический путь, V – объем вносимой пробы, мл. U выражались в мМ/мин на мг общего белка в образце.

Выбирался линейный участок для всех кривых на графике зависимости оптической плотности от времени. С помощью функции НАКЛОН в Excel вычислялась скорость изменения оптической плотности в минуту. Объем образца (фракции) – 20 мкл. Измерение концентрации общего белка в образцах производили с помощью набора реагентов Pierce BCA Protein Assay kit, Thermo Fisher согласно протоколу производителя. Значение изменения концентрации НАДН в минуту нормировали на количество общего белка в образце, находили среднее по контрольной группе и группе, которой вводили АЛК, используя функцию СРЗНАЧ в Excel. Считали стандартную ошибку, используя функцию СТАНДОТКЛОН в Excel, деля ее на корень из размера выборки. Пересчитывали полученные значения в процентные соотношения относительно контроля, чтобы объединить результаты двух независимых экспериментов, которые немного отличались по абсолютным значениям. Статистическую значимость различий в относительных активностях ферментов оценивали по критерию Манна-Уитни, расчеты производили в RStudio на языке программирования R функцией wilcox.test. Статистически значимыми считали различия с $p\text{-value} < 0,05$.

Измерение концентрации восстановленной формы глутатиона

Концентрация восстановленной формы глутатиона оценивалась с помощью 5,5'- дитио-бис(2-нитробензойной кислоты) (ДТНБ). Для этого 80 мкл фракции цитоплазматических белков

мозга мышей, взятых из экспериментов по измерению активности ФДГ, были смешаны с 30 мкл 10 мМ ДТНБ и 0,2 М Na_2HPO_4 до конечного объема 300 мкл на 96-луночной плашке из темного пластика с прозрачным дном. Смесь инкубировалась 15 минут при комнатной температуре, после чего производили измерения поглощения растворов при 412 нм. Согласно калибровочной кривой, высчитывалась концентрация прореагировавшего глутатиона, которая нормализовалась на общее содержание белка (мг), измеренное с помощью Pierce BCA Protein Assay kit согласно протоколу производителя.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Роль растительной пектинметилэстеразы и пектина в генерации эндогенных метанола и формальдегида в организме млекопитающих.

Метанол известен как смертельный яд. Большинство клинических случаев отравлений метанолом приходится на некачественные алкогольные напитки и производственные отравления. Летальной дозой метанола считается 1-2 мл/кг веса тела (Rietjens et al., 2014).

Тем не менее, инкубация клеточной линии с метанолом не приводит к гибели клеток, при условии ингибирования процесса его окисления (Kostic and Dart, 2003). Известно, что в организме человека присутствуют невысокие концентрации эндогенного метанола (Batterman et al., 1998; Batterman and Franzblau, 1997b; Chuwers et al., 1995; Cook et al., 1991; Dorokhov et al., 2012; Pronko et al., 1997; Shindyarina et al., 2014). Наибольший вклад в генерацию метанола, вероятно, вносят микрофлора кишечника и растительная диета. Клеточная стенка растений до 35% сухого веса состоит из пектина (Micheli, n.d.), у которого карбоксильные группы галактурованной кислоты образуют сложные эфиры с метанолом. Пектинметилэстераза [ЕС 3.1.1.11], фермент клеточной стенки растений, гидролизует сложноэфирные связи пектина с метанолом, что приводит к высвобождению последнего (Рисунок 3.1).

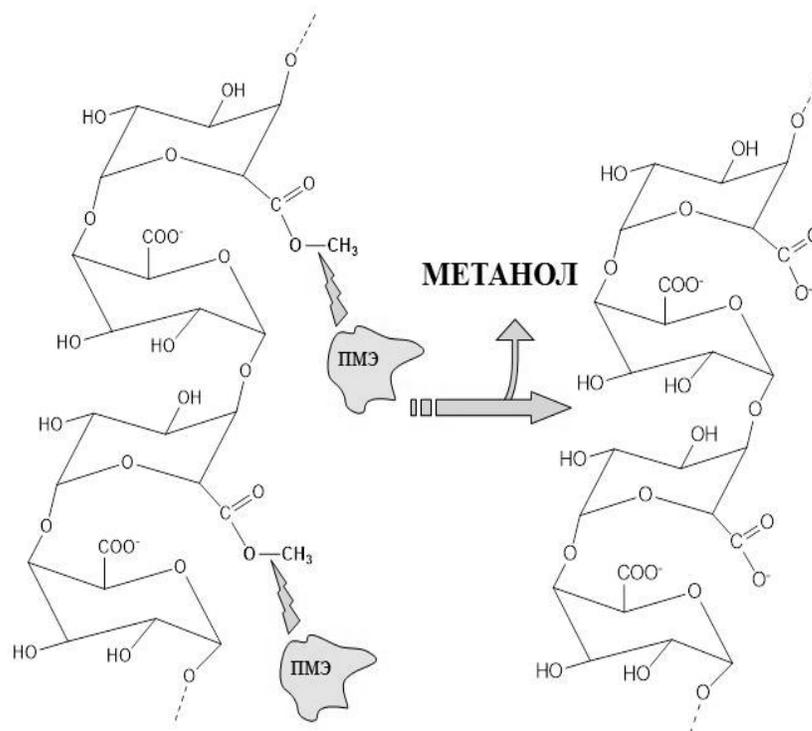


Рисунок 3.1. Схема образования метанола в результате гидролиза сложноэфирных связей пектина ферментом пектинметилэстеразой. ПМЭ – пектинметилэстераза.

После приема растительной пищи у добровольцев повышается концентрация метанола в крови, что позволяет предположить роль пектина и пектинметилэстеразы в его образовании в организме млекопитающих. Нами были протестированы 2 вида пектиновых добавок – с пектинметилэстеразой и без нее - на способность повышать концентрацию метанола в пробирке. Измерения концентрации метанола производились методом газовой хроматографии с пламенно-ионизирующим детектором. Данный метод позволяет добиться высокой чувствительности и воспроизводимости измерений, что вместе с относительно несложными протоколами подготовки проб и эксплуатации прибора дает ему преимущество перед другими методами измерения метанола в биологических жидкостях. По истечении 2 и 18 часов инкубации водных растворов при температуре 28° С, содержащих пектин, концентрация метанола в пробирках, содержащих пектинметилэстеразу, была значительно выше (Рисунок 3.2.). Таким образом, пектинметилэстераза *in vitro* гидролизует сложноэфирные связи остатков пектина с высвобождением метанола.

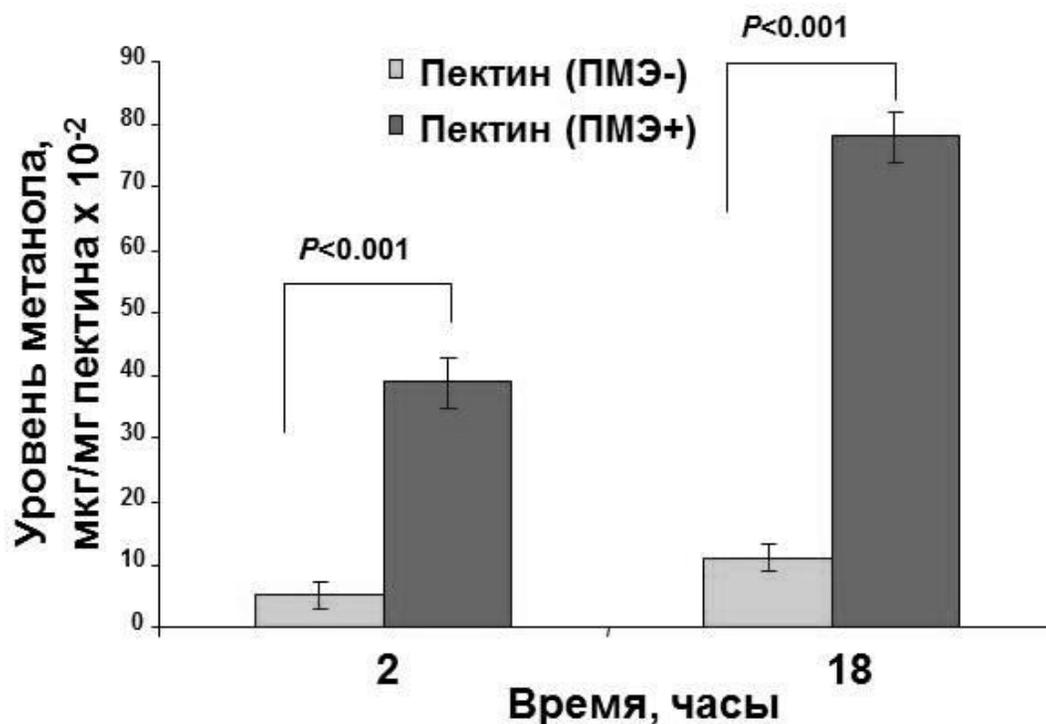


Рисунок 3.2. Концентрация метанола в водном растворе пектина с пектинметилэстеразой (ПМЭ+) и без неё (ПМЭ-), нормализованная на количество пектина, через 2 и 18 часов инкубации при 28° С. Данные представлены как среднее со стандартной ошибкой. P - p-value (t-тест Стьюдента). ПМЭ – пектинметилэстераза.

С другой стороны, часть бактерий, представленных в микрофлоре кишечника человека и мышей, содержат пектинметилэстеразу (Таблица 3.1.). Более того, бактериальные пектинметилэстеразы деметелируют пектин с высвобождением метанола *in vitro*.

Таблица 3.1. Наиболее представленные бактерии микрофлоры кишечника человека, содержащие гены, кодирующие ферменты генерирующие (ПМЭ, BioH, МГБ) и окисляющие метанол (*katG*, *katE*). PME - пектинметилэстераза, BioH – фермент синтеза биотина BioH, МГ - метилэстераза глутамата белков. Гены *katG* и *katE* кодируют бактериальные каталазы.

Бактерия	ПМЭ	BioH	МГБ	<i>katG</i>	<i>katE</i>
<i>Eubacterium rectale</i>			+		

<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	
<i>Bacteroides vulgatus</i>	+				+
<i>Alistipes finegoldii</i>					+
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	+				+
<i>Parabacteroides distasonis</i>					+
<i>Bifidobacterium breve</i>					+
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>			+		
<i>Eubacterium eligens</i>	+		+		
<i>Bacteroides fragilis</i>					+
<i>Butyrate-producing bacterium SS3/4</i>			+		
<i>Ruminococcus albus</i>	+		+		
<i>Clostridium phytofermentans</i>	+				
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>			+		+
<i>Alistipes shahii</i>	+				+
<i>Xanthomonas campestris</i>	+		+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+		+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+		+
<i>Bacillus cereus</i>		+			+
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>			+	+	+

Таким образом, при употреблении растительной пищи, богатой пектином, метанол может образовываться как в результате работы растительной, так и бактериальной пектинметилэстераз. С целью оценить способность пектина генерировать метанол *in vivo*, мы ввели мышам в желудочно-кишечный тракт пектин с пектинметилэстеразой и без нее, воду или 0,5% раствор глюкозы, по истечении 10, 30, 60 и 120 минут через хвостовую вену собрали образцы крови и измерили концентрацию метанола в сыворотке методом газовой хроматографии. Значительный скачок в концентрации метанола наблюдался у мышей, которым ввели пектин, содержащий активную пектинметилэстеразу. Таким образом, пектин выступает источником метанола *in vivo* в присутствии растительной пектинметилэстеразы (Рисунок 3.3.). Неспособность пектина в отсутствие растительной пектинметэстеразы генерировать метанол *in vivo* может быть связана с минимальным вкладом бактериальных ферментов в деметилирование пектина или отсутствием метильных групп на пектине без пектинметилэстеразы (пектин (ПМЭ-)), использовавшемся в эксперименте.

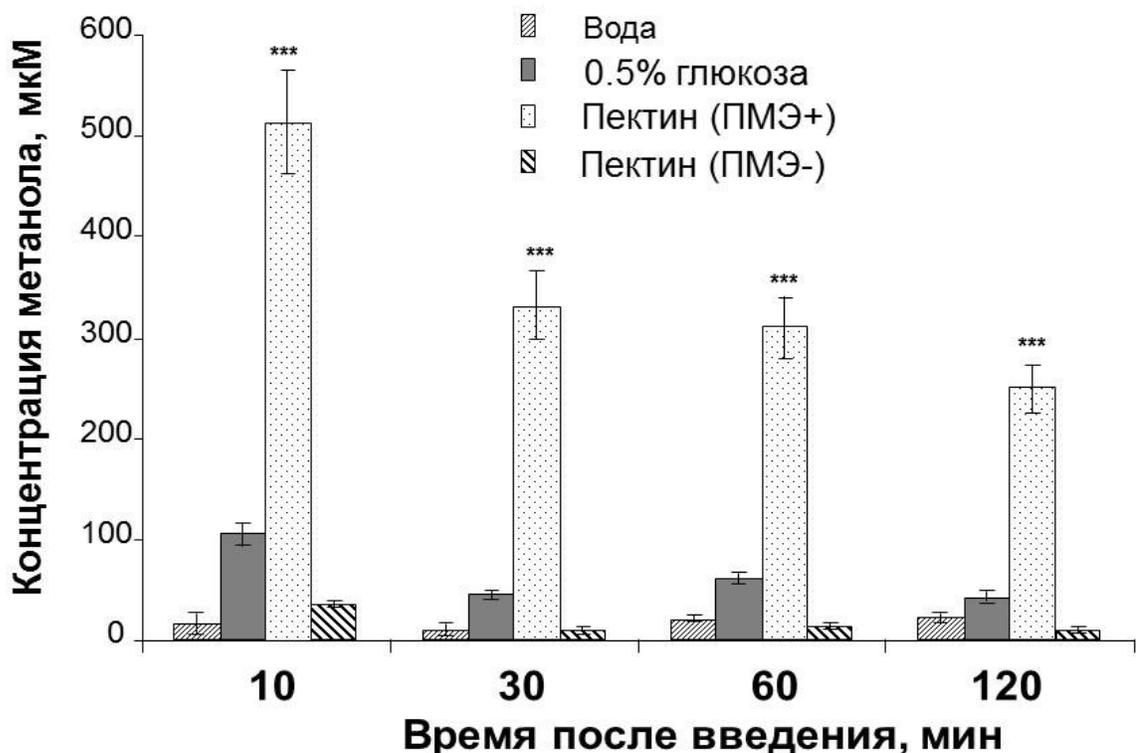


Рисунок 3.3. Концентрация метанола в сыворотке крови мышей после введения в желудочно-кишечный тракт воды, 0,5% глюкозы, пектина с пектинметилэстеразой (ПМЭ+) и без нее (ПМЭ-). Данные представлены как среднее со стандартной ошибкой. *** p -value < 0.001 (t -тест Стьюдента). ПМЭ – пектинметилэстераза.

Учитывая механизм образования метанола из пектина, мы предположили, что его прием будет увеличивать концентрацию метанола в крови людей. Для проверки гипотезы была собрана группа здоровых добровольцев, 8 мужчин и женщин в возрасте от 18 до 68 лет. У каждого из них натощак были взяты 2 мл крови из локтевой вены с интервалом в 5 минут, после чего все участники эксперимента приняли по 8 капсул (5.2 г) цитрусового пектина и на 30, 60, 90 и 120 минуте снова сдали по 2 мл крови также с интервалом в 5 минут. От крови была отделена сыворотка, из которой были высажены белки и в насадочной жидкости был измерен метанол методом газовой хроматографии и ФА методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Согласно измерениям, приём пектина приводит к увеличению концентрации метанола и ФА в крови людей (Рисунок 3.4.). Таким образом, пектин, содержащий активную пектинметилэстеразу,

является источником метанола и ФА в крови мыши и человека. Учитывая, что пектин с пектинметилэстеразой в большом количестве присутствует в клеточных стенках растений, представленные данные подтверждают участие растительной пищи в образовании эндогенного метанола и ФА и уточняют механизм.

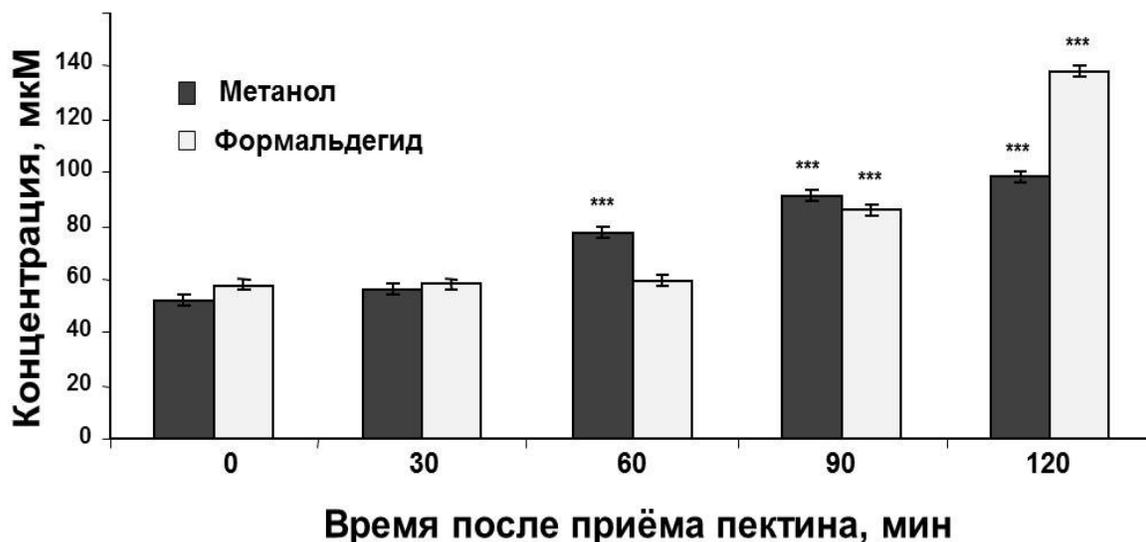


Рисунок 3.4. Концентрация метанола и формальдегида в сыворотке крови людей после приёма пектина (5.2 г). Данные представлены как среднее со стандартной ошибкой. *** *p*-value относительно 0 мин < 0.001 (*t*-тест Стьюдента).

3.2. Микрофлора желудочно-кишечного тракта генерирует эндогенный метанол

В организме млекопитающих окисление метанола проходит при основном участии 3 путей – каталазы (кодируется геном *CAT*), цитохромоксидазы P450 2E1 (*CYP2E1*) и алкогольдегидрогеназ I класса. Семейство алкогольдегидрогеназ включает до 7 классов ферментов, каждый со своей субстратной специфичностью. Этанол и метанол в основном метаболизируют алкогольдегидрогеназы I класса. Важно отметить, что в геноме мыши присутствует ген одной алкогольдегидрогеназы I класса (*ADH1*), в то время как у человека он представлен 3 ферментами, кодируемых генами *ADH1A*, *ADH1B* и *ADH1C*, среди которых *ADH1B* играет важнейшую роль. В печени мыши и человека алкогольдегидрогеназы I класса окисляют до 90% экзогенных метанола и

этанола. Среди всех ферментов, окисляющих короткие спирты, алкогольдегидрогеназа I класса, β субъединица (*ADH1B*) обладает самым низким значением K_m относительно метанола (0,05 – 1,2 мМ) и этанола (6,0 – 7,0 мМ), в связи с чем играет ключевую роль в их ферментативном клиренсе.

Несмотря на внушительный список известных экзогенных источников метанола, он присутствует в биологических жидкостях млекопитающих, не подверженных их воздействию. Наличие базового уровня метанола при постоянной работе ферментов, окисляющих его, указывает на присутствие эндогенных источников. Для экспериментального подтверждения гипотезы, мы использовали подход, в котором ингибировали процесс окисления метанола с помощью 4-метилпиразола или этанола. 4-метилпиразол ингибирует алкогольдегидрогеназы I класса, формируя стабильные комплексы ферментов с НАД⁺. За счет низкой константы ингибирования (9-100 мкМ) алкогольдегидрогеназ и невысокой токсичности, 4-метилпиразол широко используется в клинической практике для лечения отравлений метанолом. Для экспериментов использовали по десять мышей линии balb/c случайным образом разделенных на две равные группы. Пробы крови из хвостовой вены отбирались у мышей до введения 4-метилпиразола или равного объема физиологического раствора и через 15, 30, 60, 90, 120 и 180 минут после введения. В очищенной от белков сыворотке измеряли метанол и этанол методом газовой хроматографии и ФА методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Концентрация всех трех веществ значительно увеличивалась уже на 60 минуте после введения ингибитора алкогольдегидрогеназ (Рисунок 3.5.). Таким образом, организм мыши постоянно генерирует метанол, однако неизвестно, что является его источником.

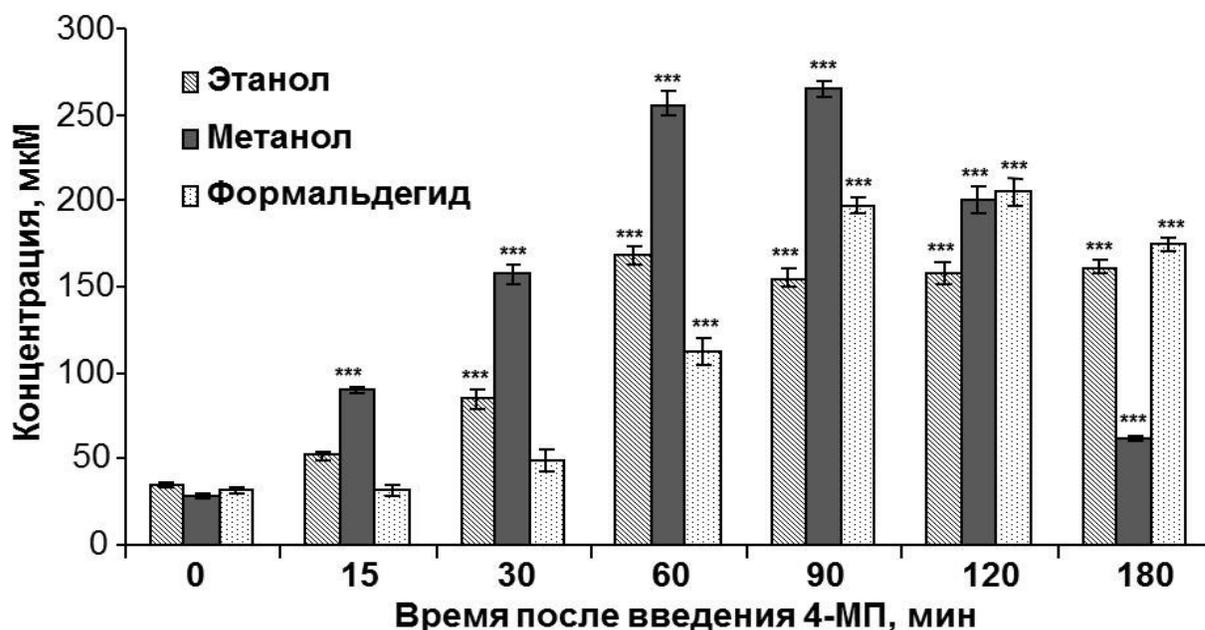


Рисунок 3.5. Концентрация метанола, этанола и формальдегида в сыворотке крови мышей после введение 4-метилпиразола (10 мг/кг). Данные представлены как среднее со стандартной ошибкой. *** p -value относительно 0 мин < 0.001 (t -тест Стьюдента). 4-МП – 4-метилпиразол.

Печень играет важнейшую роль в метаболизме коротких спиртов. Предположительно, эндогенный метанол пополняется из путей метаболизма одноуглеродных соединений, как клеток хозяина, так и бактерий его микрофлоры. Однако до сих пор не было известно соотношение вкладов каждого из них. Вместе с накоплением эндогенного метанола в крови, нами было обнаружено увеличение его концентрации в гомогенатах печени (Рисунок 3.6. б). В тоже время, печень содержит большое количество кровеносных сосудов, в связи с чем повышенная концентрация метанола после введение 4-метилпиразола может быть связана с контаминацией гомогенатов печени кровью. Мы поставили серию экспериментов на изолированной перфузионной печени (Рисунок 3.6. а), таким образом исключив влияние крови на измерения метанола. После изоляции печень промывалась от крови буфером Кребса-Хенселейта. Перфузат, содержащий примеси крови, был удален из системы. Через 30 минут после изоляции, печень была полностью промыта, и в систему трубок был введен раствор 4-метилпиразола (10 мг/кг), с интервалом в 15 минут были собраны 4 образца перфузата

объемом 2 мл. Измерения метанола показали, что изолированная печень не способна генерировать метанол (Рисунок 3.6. в).

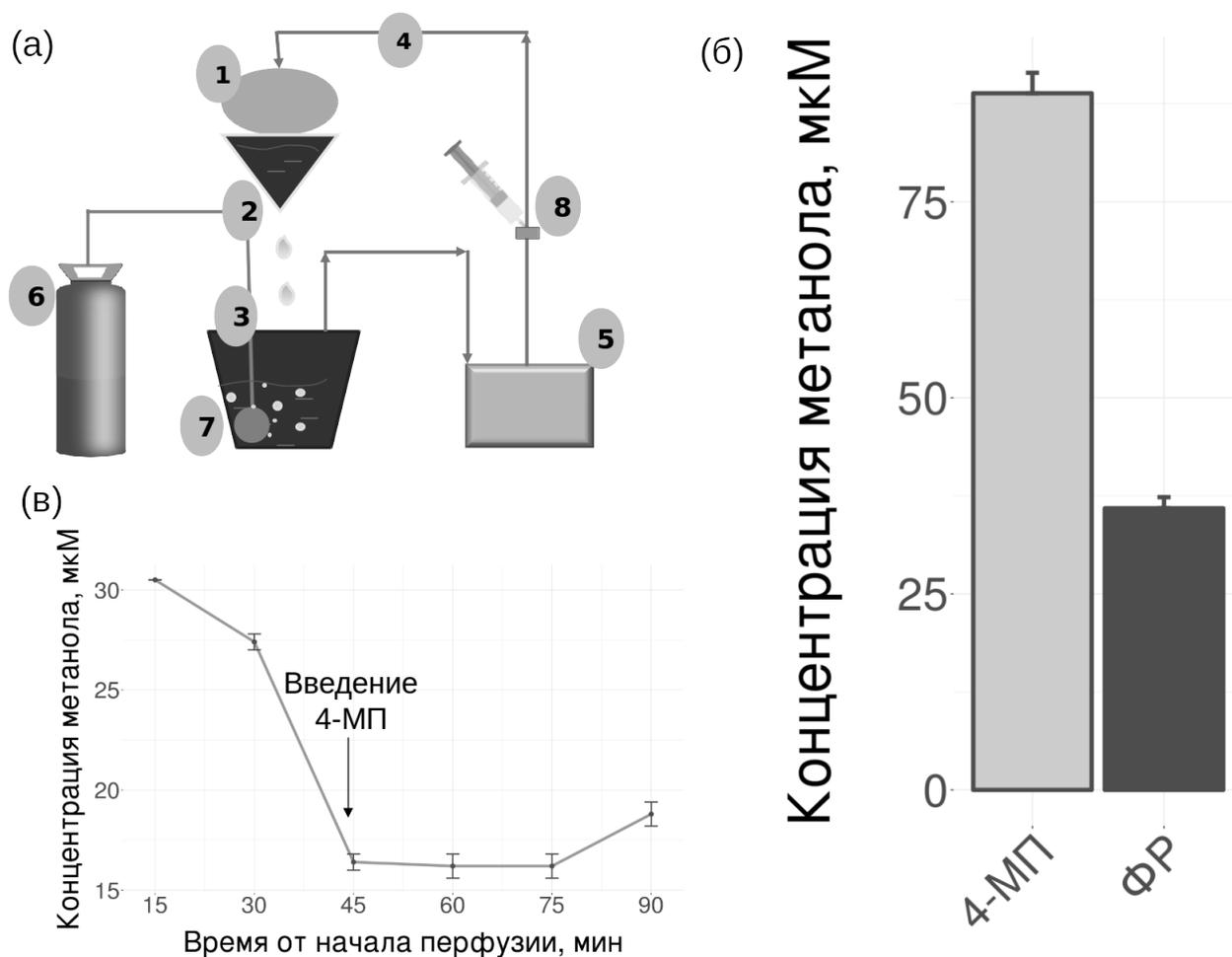


Рисунок 3.6. Вклад печени в генерацию эндогенного метанола. а) Схематическое изображение установки для перфузии печени, где 1 — изолированная печень крысы, 2 — верхняя чаша с печенью, 3 — нижняя чаша, 4 — выходящая из насоса трубка, 5 — перистальтический насос, 6 — баллон с углекислым газом, 7 — оксигенатор, 8 — место ввода веществ в перфузат, (б) концентрация метанола в гомогенате печени после введения 4-метилпиразола или физиологического раствора. Данные представлены как среднее со стандартными отклонениями, (в) концентрация метанола в перфузате, собранного из верхней чашки, после изоляции печени и введения 4-метилпиразола. 4-МП — 4-метилпиразол, ФР — физиологический раствор. Данные представлены как среднее со стандартными отклонениями.

Активности ферментов аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ) во время перфузии оставались в пределах нормы, что говорит о сохранении жизнеспособности гепатоцитов (Таблица 3.2.). Таким образом, печень не участвует в генерации эндогенного метанола, и его источник находится за ее пределами.

Таблица 3.2. Активность ферментов АЛТ, АСТ и ЩФ в перфузате изолированной печени. АСТ - аспаратаминотрансфераза, АЛТ - аланинаминотрансфераза, ЩФ – щелочная фосфатаза, НА – нет активности. Данные представлены как среднее со стандартным отклонением, по 2 образца на временную точку, 2 измерения.

Время после изоляции	АЛТ, U/L	АСТ, U/L	ЩФ, U/L
15 минут	3.4 ± 0.57	13.9 ± 1.41	НА
30 минут	3.65 ± 0.07	18.1	НА
45 минут	4.2 ± 0.14	19.35 ± 0.21	НА
60 минут	5.2 ± 0.14	22.95 ± 0.49	НА
75 минут	5.9 ± 0.14	25.5 ± 0.71	НА
90 минут	6.3	27.6	НА

Вторым вероятным источником эндогенного метанола является микрофлора кишечника: бактериальный консорциум производит огромное количество органических соединений, участвующих в метаболизме млекопитающих, в то же время известно множество видов бактерий, в геноме которых закодированы ферменты, катализирующие реакции с образованием метанола (Таблица 1). Чтобы оценить вклад микрофлоры в уровень эндогенного метанола, мы ввели крысам 4-метилпиразол, после чего у половины из них была удалена часть желудочно-кишечного тракта (Рисунок 3.7. а). Через 90 минут у обеих групп собрали образцы крови, отделили сыворотку, высадили белки и измерили метанол в надосадочной жидкости на газовом хроматографе. У крыс, которым сделали резекцию, накопление метанола происходило медленнее (Рисунок 3.7. б), что

указывает на участие микрофлоры желудочно-кишечного тракта в его образовании. Таким образом, ингибирование окисления метанола через алкогольдегидрогеназу I класса приводит к накоплению эндогенного метанола при активном участии микрофлоры кишечника.

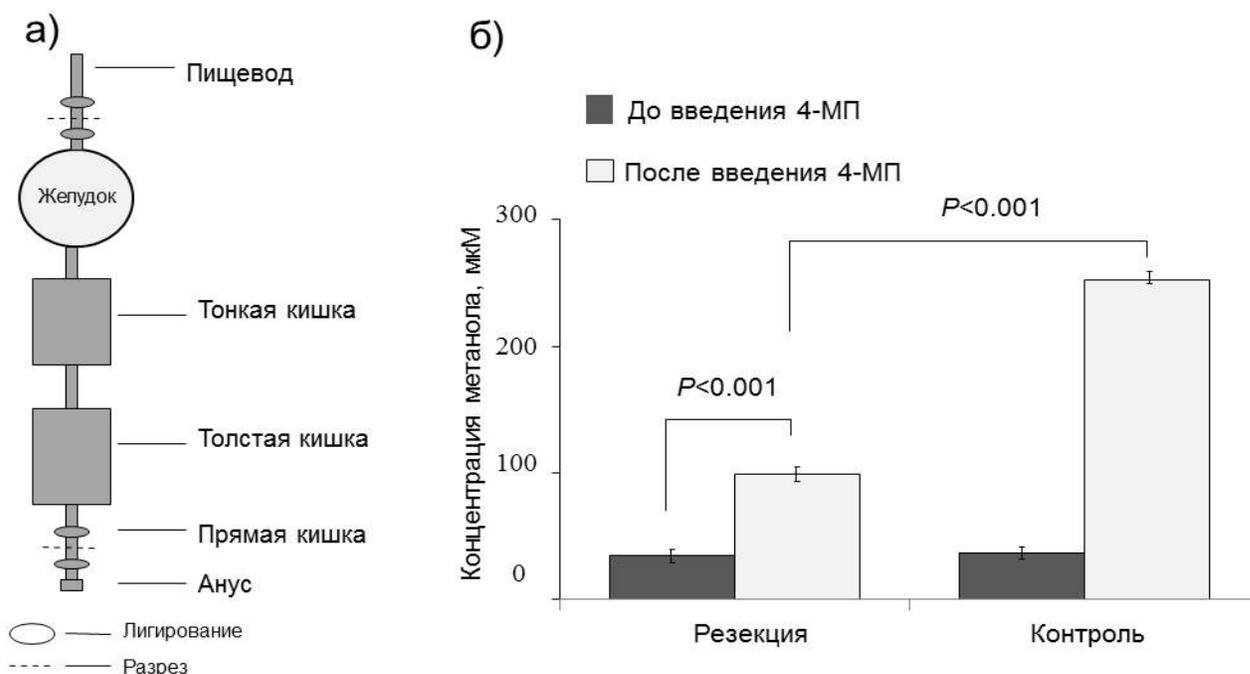


Рисунок 3.7. (а) Схема резекции желудочно-кишечного тракта крысы. (б) Концентрация метанола в крови крыс, которым вводили 4-метилпиразол (10 мг/кг). Данные представлены как среднее со стандартной ошибкой. P - p-value (t-тест Стьюдента). 4-МП – 4-метилпиразол.

3.3. Повышение концентрации метаболитического метанола и ФА в сыворотке крови человека и млекопитающих сопровождается активизацией кластера генов, ответственных за метаболизм коротких спиртов

В то время как эндогенный метанол присутствует в организме млекопитающих, вопрос о его функции остается открытым. Помимо участия в метаболических процессах, например, метаболизме одноуглеродных соединений и метилирования, метанол может служить сигнальной молекулой, регулирующей экспрессию генов, что подтверждается полученными нами данными по анализу транскриптома на микрочипах. Нами было показано, что внутрибрюшинное введение 4-

метилпиразола и метанола изменяет уровень мРНК нескольких тысяч генов в мозге мышей, и 611 генов в мозге мышей реагируют на введения обоих веществ (Рисунок 3.8.). В тоже время ингаляция парами метанола приводит к изменению профиля экспрессии другой группы генов, слабо пересекающейся с эффектами от увеличения концентрации метанола в крови (Рисунок 3.8.). Изменяют свой уровень во всех трех группах 56 транскриптов.

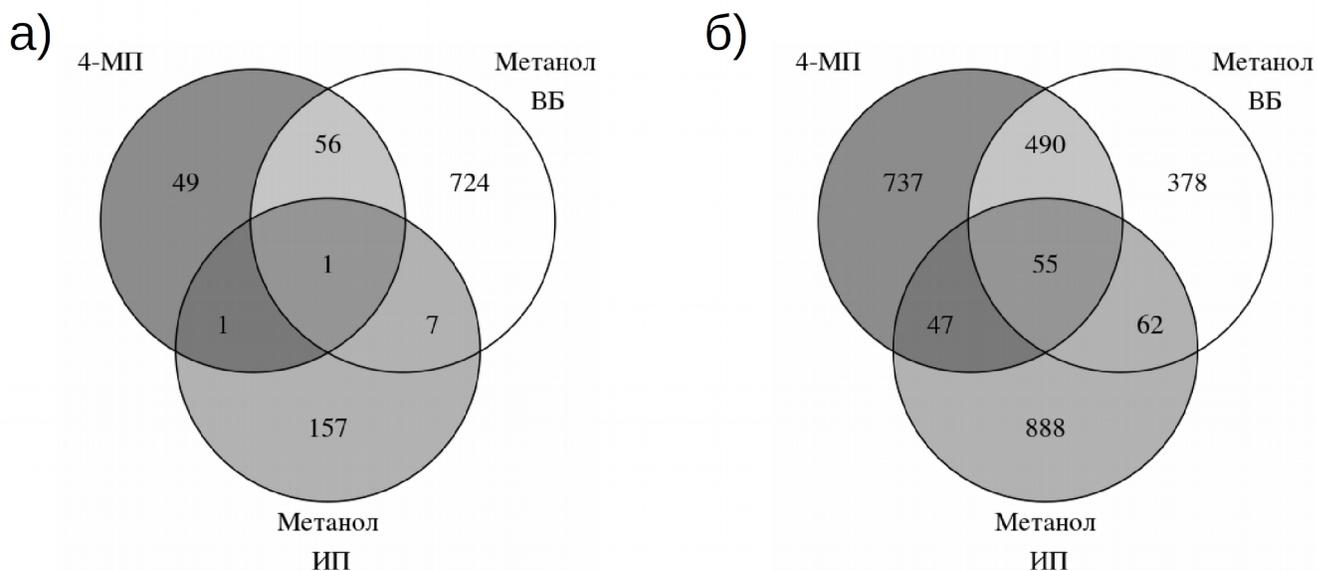


Рисунок 3.8. Диаграмма Венна с пересечением количества генов, уровень мРНК которых а) увеличился и б) уменьшился в мозге мышей в ответ на внутрибрюшинное введение метанола, ингаляцию парами метанола или введение 4-метилпиразола. Изменением уровня мРНК считали увеличение или уменьшение уровня сигнала в 1,3 раза по сравнению с контрольными образцами при $q\text{-value} < 0.05$. ВБ — внутрибрюшинное введение, ИП — ингаляция парами метанола, 4-МП — 4-метилпиразол.

Среди дифференциально экспрессирующихся генов в ответ на увеличение концентрации метанола, перепредставлены те, которые кодируют субъединицы рибосомы, протеасомы и белки процесса убиквитинирования, а также, среди прочих, гены, связанные с патогенезом болезни Альцгеймера и Паркинсона (Таблица 3.3.).

Таблица 3.3. Данные по сигнальным каскадам, в которых перепредставлены транскрипты статистически значимо изменяющие уровень в мозге мышей в ответ на увеличение концентрации метанола в крови после внутрибрюшинного введения как метанола, так и 4-метилпиразола, согласно базе данных DAVID.

Путь	Кол-во	P-value	Гены
Сигнальные пути с повышенной экспрессией генов в ответ на метанол			
Рибосома	21	1E-10	<i>RPL18, MRPS16, RPL36A, MRPL3, MRPS12, MRPS11, MRPS10, RPL27A, MRPS21, RPL39, RPS5, RPS8, RPL23, RPL13A, RPL31, RPL9, RPL34, RPS12, RPL12, RPL36AL, RPS24</i>
Болезнь Паркинсона	11	0.003	<i>NDUFA5, NDUFB6, UQCRH, SLC6A3, UBE2G1, NDUFA6, NDUFB9, SNCA, NDUFC2, ATP5G2, PARK7</i>
Амфетаминовая зависимость	7	0.005	<i>FOS, ARC, ATF4, SLC6A3, CALM3, FOSB, SIRT1</i>
Холинергический синапс	9	0.005	<i>FOS, ATF4, KRAS, GNA11, CHRNA4, GNB5, PIK3CA, KCNJ12, GNG4</i>
Убиквитин-опосредованный протеолиз	10	0.006	<i>RFWD2, PRPF19, ANAPC5, UBE2G1, SIAH1A, UBE2M, SKP2, UBE3C, RCHY1, RBX1</i>
Болезнь Альцгеймера	11	0.009	<i>NDUFA5, NDUFB6, UQCRH, APOE, NDUFA6, NDUFB9, SNCA, NDUFC2, CALM3, ATP5G2, PSENEN</i>
Окислительное фосфорилирование	9	0.016	<i>NDUFA5, NDUFB6, UQCRH, NDUFA6, NDUFB9, NDUFC2, ATP5L, ATP5G2, PPA2</i>
Созревание белка в ЭПР	10	0.017	<i>PREB, ATF4, SEC61B, PDIA3, VCP, RNF5, UBE2G1, NSFL1C, UBQLN1, RBX1</i>
Протеасома	5	0.021	<i>PSMB5, PSMB7, PSMB1, PSMC3, PSMD8</i>
Дофаминергический синапс	8	0.038	<i>FOS, ATF4, SLC6A3, PPP2R5C, GNB5, CALM3, COMT, GNG4</i>

Пероксисома	6	0.045	<i>NUDT19, MPV17, PMVK, SOD1, PRDX1, SCP2</i>
Транспорт РНК	9	0.046	<i>SUMO3, RPP38, NXT1, RAN, EEF1A2, MAGOH, EIF1B, EIF2B5, THOC1</i>
Алкоголизм	10	0.048	<i>ATF4, KRAS, H2AFV, SLC6A3, NTRK2, GNB5, CALM3, H2AFY, FOSB, GNG4</i>
Сигнальные пути со сниженной экспрессией генов в ответ на метанол			
Процессинг и презентация антигена	8	0.0001	<i>H2-K1, H2-D1, H2-T23, H2-AB1, HSPA1B, CD74, B2M, TAPBP</i>
Эндоцитоз	11	0.004	<i>H2-K1, FLT1, TFRC, SH3GLB1, H2-D1, H2-T23, HSPA1B, DNM1, CSF1R, F2R, VPS25</i>
Вирусный миокардит	6	0.004	<i>H2-K1, ACTB, H2-D1, DAG1, H2-T23, H2-AB1</i>
Регуляция актинового цитоскелета	9	0.008	<i>ACTB, WASF2, CYFIP2, ITGB4, ACTN2, GNG12, PIP4K2A, PIK3R3, F2R</i>
Сигнальный путь HIF-1	6	0.013	<i>CDKN1A, FLT1, TFRC, SLC2A1, PIK3R3, ANGPT2</i>
Сигнальный путь PI3K-Акт	12	0.019	<i>CDKN1A, SGK1, FLT1, ITGB4, GNG12, PIK3R3, ANGPT2, CSF1R, F2R, GNG7, DDIT4</i>
Молекулы клеточной адгезии	7	0.022	<i>H2-K1, NCAM1, H2-D1, H2-T23, ESAM, H2-AB1, CLDN11</i>
Фагосома	7	0.030	<i>H2-K1, ACTB, TFRC, TUBA3B, H2-D1, H2-T23, H2-AB1</i>
Болезнь трансплантат против хозяина	4	0.033	<i>H2-K1, H2-D1, H2-T23, H2-AB1</i>

Сравнение списков генов, уровень мРНК которых изменился в ответ на введение 4-метилпиразола, этанола и метанола, согласно данным микроматриц, показал, что все три вещества оказывают похожий эффект на экспрессию генов в мозге мыши (Рисунок 3.9.).

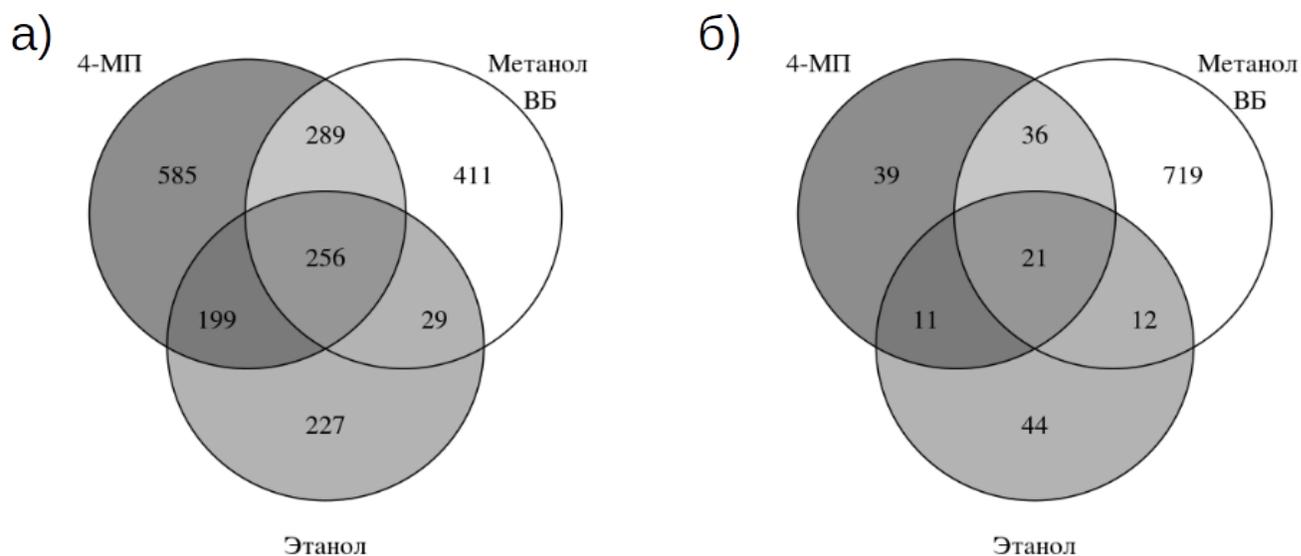


Рисунок 3.9. Диаграмма Венна с пересечением количества генов, уровень мРНК которых а) увеличился и б) уменьшился в мозге мышей в ответ на внутрибрюшинное введение метанола (0,12 г/кг), 20% этанола или 4-метилпиразола (10 мг/кг). Изменением уровня мРНК считали увеличение или уменьшение уровня сигнала в 1,3 раза по сравнению с контрольными образцами при $q\text{-value} < 0.05$. ВБ — внутрибрюшинное введение, 4-МП — 4-метилпиразол.

Изменения уровня выбранных для последующего анализа 7 мРНК, реагирующих на введение 4-метилпиразола, значительно коррелируют (коэффициент корреляции Пирсона = 0.978, $p\text{-value} < 0.001$) с изменениями, вызванными ингаляцией парами метанола (Рисунок 3.10.).

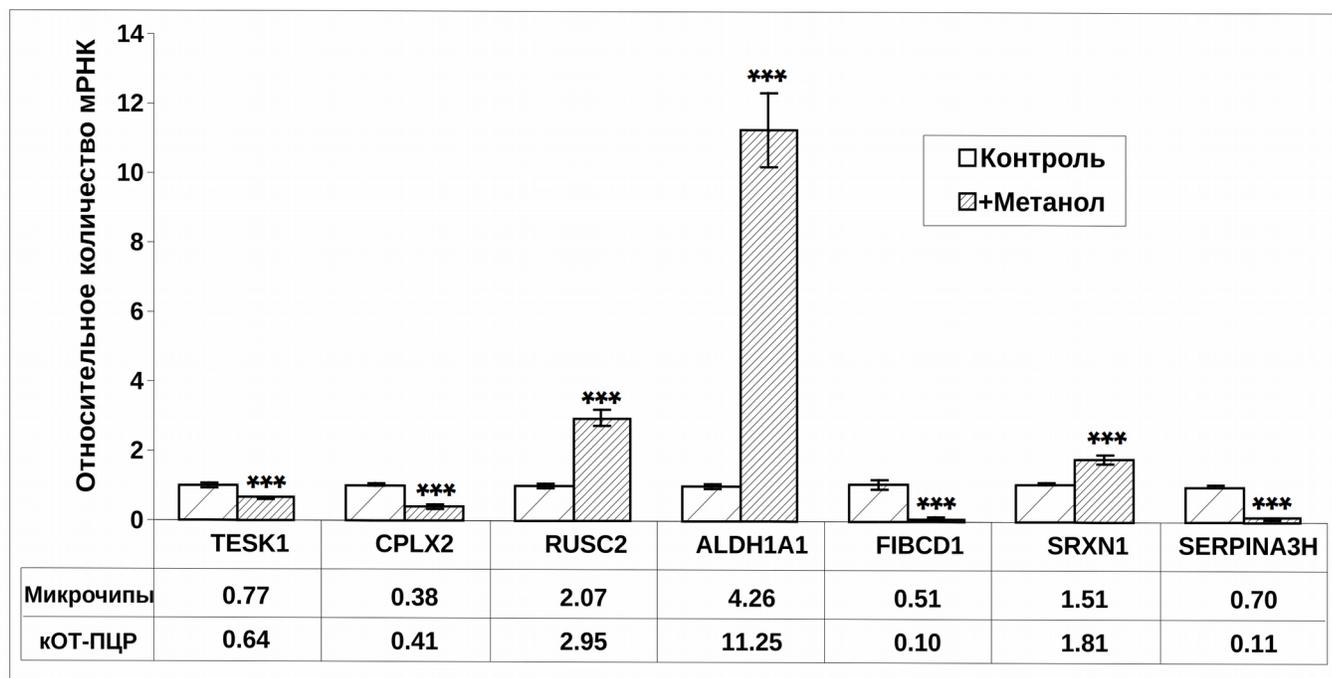


Рисунок 3.10. Относительное изменение уровня мРНК генов с дифференциальной экспрессией в мозге мышей на 60 минуте ингаляции парами метанола или физиологического раствора в качестве контроля. В таблице представлены средние значения изменения уровня сигнала на микроматрицах на 120 минуте после введения 4-метилпиразола (10 мг/кг) относительно контроля и относительное изменение мРНК на кОТ-ПЦР на 60 минуте ингаляции парами метанола относительно контроля. Данные представлены как среднее со стандартной ошибкой. *** p -value < 0.001 (t -тест Стьюдента).

Печень детоксифицирует основную часть коротких спиртов за счет присутствия большого количества ферментов алкогольдегидрогеназ I класса. С целью исследовать эффекты метанола как потенциальной сигнальной молекулы на печень, был проведен анализ методом количественной ОТ-ПЦР в образцах печени после введения мышам 4-метилпиразола. Оказалось, что увеличение концентрации метанола в крови мышей приводит к изменению соотношения мРНК генов его метаболизма таким образом, чтобы снизить скорость образования ФА в печени. Так, наблюдалось повышение уровня мРНК альдегиддегидрогеназы 1 и 2 (*ALDH1*, *ALDH2*), кодирующих ферменты, окисляющие ФА, и в то же время снижается уровень мРНК алкогольдегидрогеназы (*ADH*), фермента, образующего ФА в результате окисления метанола (Рисунок 3.11.). Вероятно,

переформатирование метаболизма ФА в сторону снижения его концентрации необходимо для защиты клеток от его губительного действия.

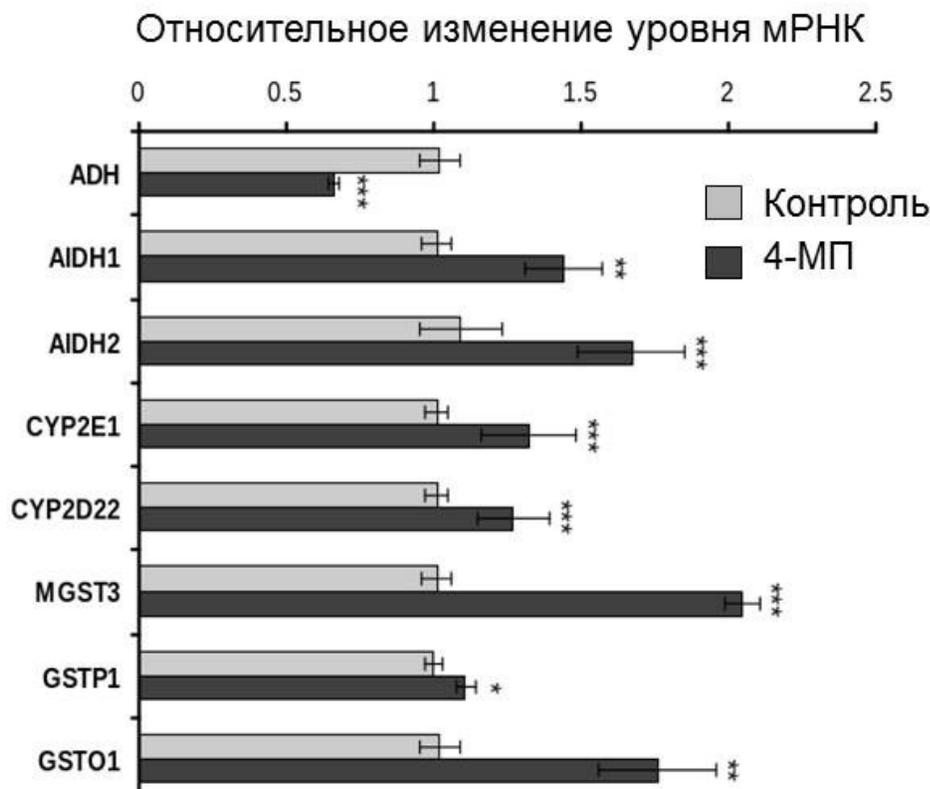


Рисунок 3.11. Относительное изменение уровня мРНК генов, кодирующих ферменты, участвующие в метаболизме метанола, в печени мышей на 90 минуте после введения 4-метилпиразола или физиологического раствора в качестве контроля. Данные представлены как среднее со стандартной ошибкой. *** p -value < 0.001, ** p -value < 0.01, * p -value < 0.05 относительно контроля (t -тест Стьюдента). 4-МП – 4-метилпиразол.

Этанол конкурентно ингибирует процесс окисления метанола через алкогольдегидрогеназы I класса. Он связывается с активным центром фермента с большей аффинностью, чем метанол, тем самым замедляя процесс его окисления. В связи с чем был использован нами в экспериментах на добровольцах взамен 4-метилпиразола. Добровольцы сдавали 7 мл крови натощак, выпивали 40% алкоголь (Рисунок 3.12. а) или вино (Рисунок 3.12. б), и по истечении 15, 30, 60, 90 и 120 минут сдавали по 7 мл крови. Из 2 мл крови отделяли сыворотку, высаживали белки и измеряли метанол

и ФА. Ингибирование окисления метанола через алкогольдегидрогеназу 1 приводит к значительному накоплению метанола и ФА в сыворотке крови человека (Рисунок 3.12.). Полученные данные позволяют сделать вывод, что в организме мыши и человека присутствуют эндогенные источники метанола, генерирующие его, в то же время его низкий уровень поддерживается за счет постоянной работы окисляющих его ферментов.

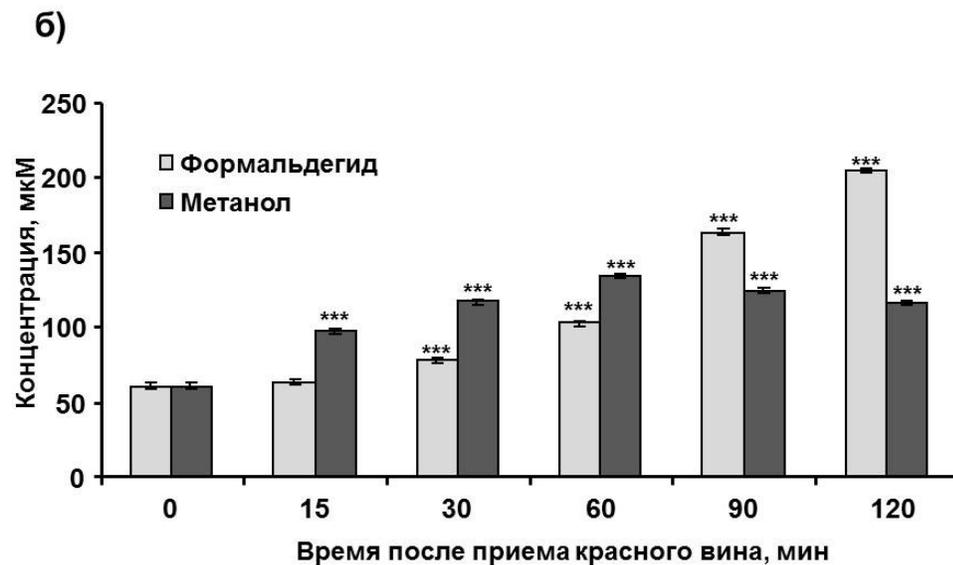
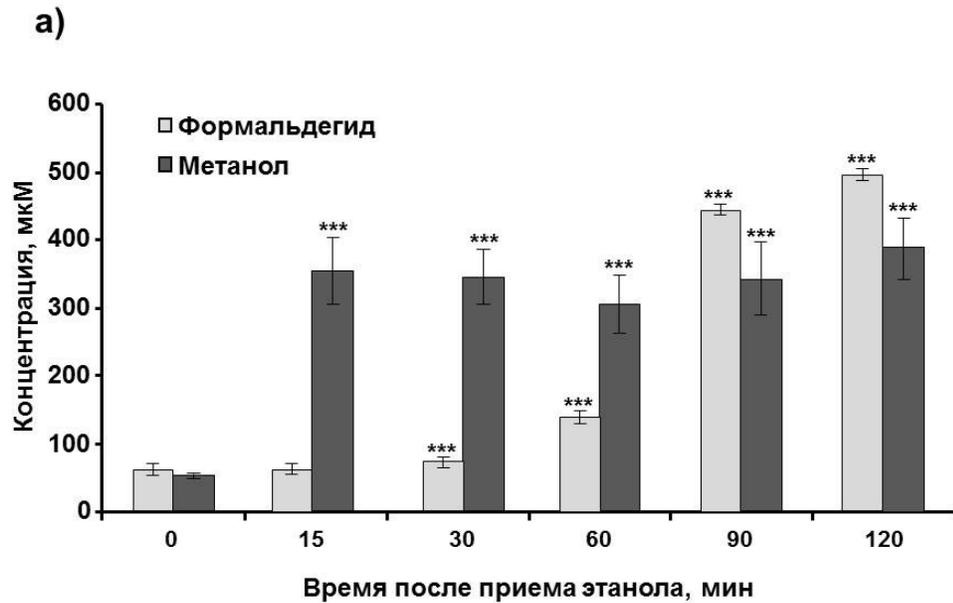


Рисунок 3.12. Концентрация метанола и формальдегида в сыворотки крови людей после приема б) этанола и а) красного вина. Данные представлены как среднее со стандартной ошибкой. *** p-value относительно 0 мин < 0.001 (t-тест Стьюдента).

3.4. Эндогенный антиоксидант альфа-липоевая кислота участвует в регуляции метаболизма эндогенного формальдегида.

Эндогенный метанол окисляется клетками млекопитающих до токсичного ФА. Ключевую роль в метаболизме эндогенного ФА играют альдегиддегидрогеназа 2 и алкогольдегидрогеназа III класса (или формальдегиддегидрогеназа). Несмотря на постоянный процесс окисления, в крови млекопитающих детектируется до нескольких десятков микромоляр/л ФА. Вследствие генотоксичных и протеотоксичных эффектов на клетки млекопитающих, повышенное содержание ФА связывают с рядом патологий, что делает актуальной задачу поиска веществ, регулирующих его метаболизм. Известно, что введение альфа-липоевой кислоты увеличивает активность альдегиддегидрогеназы 2 в крови человека и в слизистой оболочке кишечника крыс^{20,21}. Из-за низкого уровня метанола и ФА в крови мышей, методологически сложно оценить эффекты альфа-липоевой кислоты на нативных мышах, поэтому мы использовали 4-метилпиразол с целью увеличить концентрации эндогенного метанола и ФА. У мышей, которым помимо 4-метилпиразола вводили альфа-липоевую кислоту, статистически значимо снижалась концентрация метанола (Рисунок 3.13. а) и ФА (Рисунок 3.13. б). Аналогичный эффект на ФА был получен при введении активатора альдегиддегидрогеназы 2 — adla-1 (Рисунок 3.13. в).

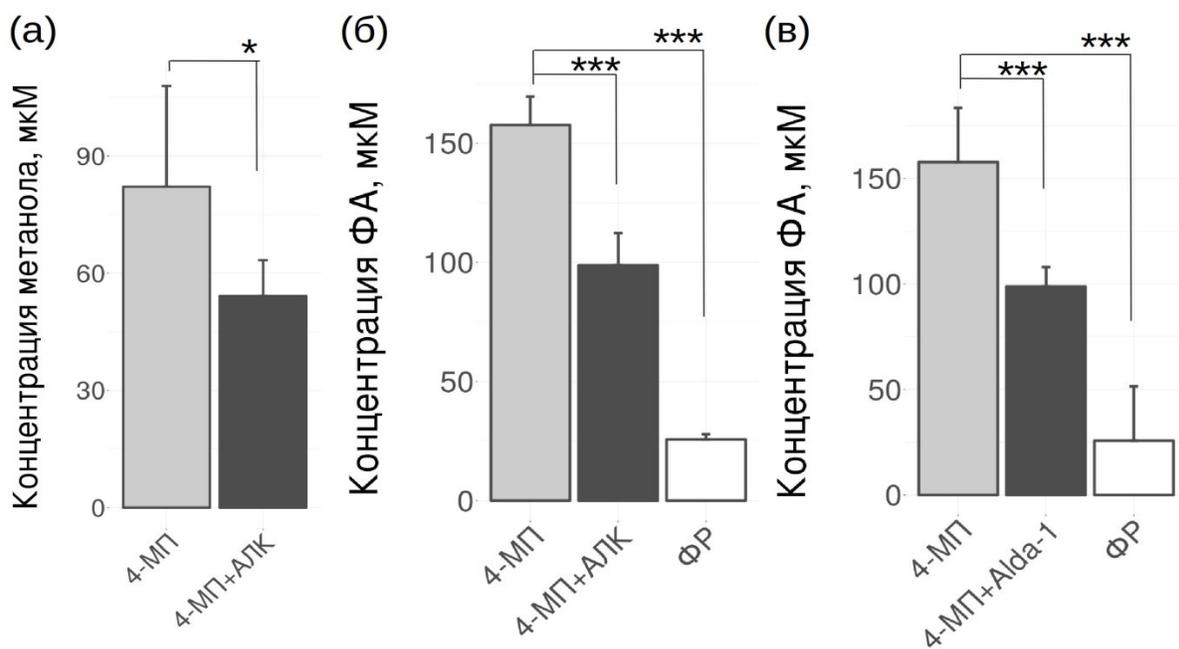


Рисунок 3.13. Концентрация метанола (а) и формальдегида (б) в крови мышей после введения альфа-липоевой кислоты и активатора альдегиддегидрогеназы 2 — *alda-1* (в). АЛК — альфа-липоевая кислота, 4-МП — 4-метилпиразол, ФР — физиологический раствор, ФА - формальдегид. Данные представлены как среднее со стандартным отклонением. *** p -value < 0,001, ** p -value < 0,01, * p -value < 0,05 (t -тест Стьюдента).

В связи со снижением концентрации как метанола, так и ФА, при введении альфа-липоевой кислоты, мы предположили, что альфа-липоевая кислота скорее активизирует процесс их окисления, чем альтернативные пути выведения, в организме мыши, вероятно, через альдегиддегидрогеназу 2.

Так как печень одновременно является и основным органом, детоксицирующим метанол с ФА, и депо альфа-липоевой кислоты, мы предположили ее участие в снижении концентрации ФА при введении альфа-липоевой кислоты. Для проверки гипотезы в изолированную печень крысы (Рисунок 3.14. а) были последовательно введены метанол в дозировке 80 мг/кг и через 60 минут альфа-липоевая кислота в дозировке 20 мг/кг. Измерение концентрации ФА в перфузате не выявило влияния альфа-липоевой кислоты на его метаболизм в изолированной печени (Рисунок 3.14. б).

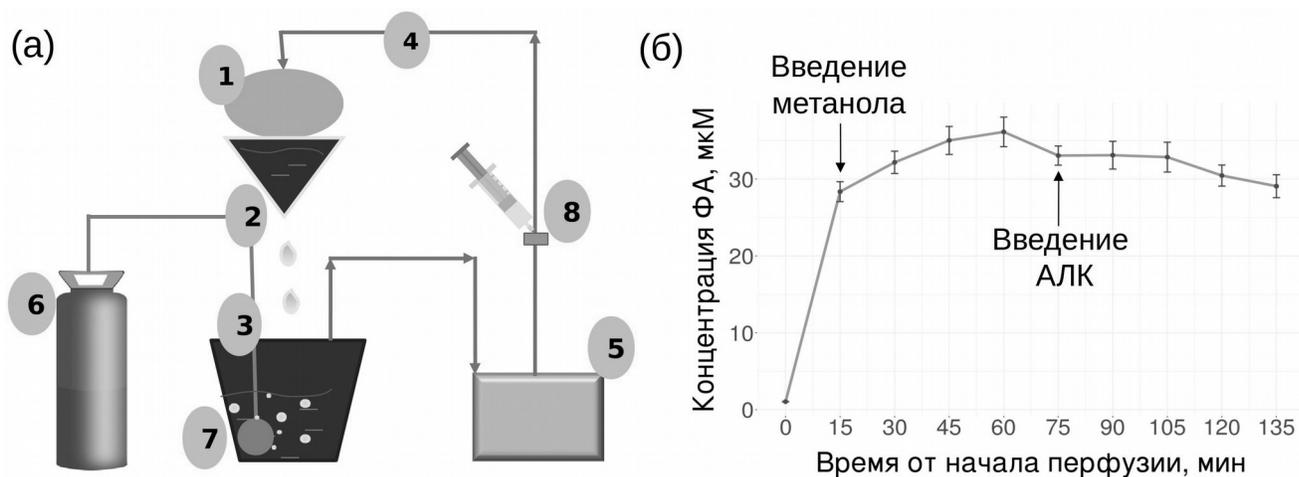


Рисунок 3.14. (а) Схема установки для перфузии печени, где 1 — изолированная печень крысы, 2 — верхняя чаша с печенью, 3 — нижняя чаша, 4 — выходящая из насоса трубка, 5 — перистальтический насос, 6 — баллон с углекислым газом, 7 — оксигенатор, 8 — место ввода веществ в перфузат, (б) концентрация ФА в перфузате, собранного из верхней чаши, после последовательного введения метанола и альфа-липоевой кислоты. 4-МП — 4-метилпиразол, АЛК — альфа-липоевая кислота, ФР — физиологический раствор. Данные представлены как среднее со стандартными отклонениями.

С целью определения органа, отвечающего за активацию ферментативной защиты от ФА, нами была поставлена количественная ОТ-ПЦР на РНК, выделенную из целого мозга и печени мышей, отобранных в ходе предыдущего эксперимента. Для анализа были выбраны гены, кодирующие 5 основных ферментов метаболизма метанола: *ADH1*, *CAT*, *CYP2E1*, *ALDH2* и *ADH5*. В печени уровень мРНК всех проанализированных генов не отличался между опытной и контрольной группами мышей (Рисунок 3.15. а), что согласуется с данными, полученными на изолированной печени. Интересно, что мы видим статистически значимое увеличение уровня мРНК гена *ALDH2* в мозге мышей, которым вводили альфа-липоевую кислоту (20 мг/кг) (Рисунок 3.15. б). Известно, что альфа-липоевая кислота встречается в организме млекопитающих повсеместно. В тоже время, метанол и ФА способны диффундировать сквозь клеточные мембраны и проходить гематоэнцефалический барьер, что способствует их распределению по всем тканям организма. Таким образом, потенциально любой орган может быть вовлечен в снижение ФА при

введении альфа-липоевой кислоты. Для определения вклада остальных органов в опосредованное альфа-липоевой кислотой снижение ФА мы проанализировали изменение уровня мРНК в почках, сердце, селезенке и отделах головного мозга мышей, которым вводили альфа-липоевую кислоту (20 мг/кг) вместе с 4-метилпиразолом (10 мг/кг) или только 4-метилпиразол (10 мг/кг). Как и в случае с печенью, мы не увидели эффекта на уровень основных ферментов метаболизма ФА ни в почках, ни в сердце мышей. Единственным органом, в котором происходила активация основных ферментов метаболизма ФА, помимо головного мозга, была селезенка (Рисунок 3.15. в). Согласно данным количественной ОТ-ПЦР, уровень мРНК гена *ADH5* в селезенке статистически значимо повышался в ответ на введение альфа-липоевой кислоты. Для детального анализа эффекта альфа-липоевой кислоты на головной мозг мыши, нами были отделены кора, мозжечок и гиппокамп от остальных отделов головного мозга. Статистически значимо уровень мРНК *ALDH2* повышался только в гиппокампе мышей, обработанных альфа-липоевой кислотой (Рисунок 3.15. г). Таким образом, гиппокамп ответственен за эффекты альфа-липоевой кислоты на кластер генов метаболизма ФА, которые мы детектируем на целом головном мозге мыши.

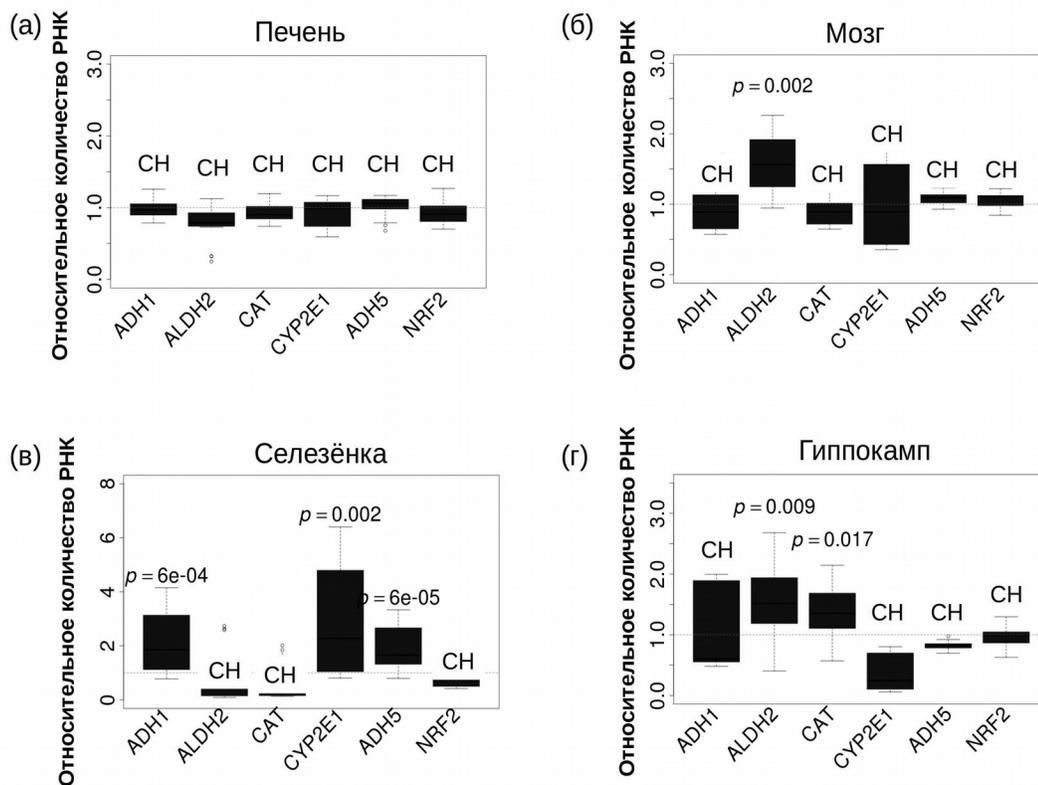


Рисунок 3.15. Относительное количество мРНК генов *ADH1*, *ALDH2*, *CAT*, *CYP2E1*, *ADH5* и *NFE2L2 (NRF2)* в (а) печени, (б) мозге, (в) селезёнке и (г) гиппокампе мышей, которым вводили альфа-липоевую кислоту вместе с 4-метилпиразолом, по отношению к мышам, которым вводили только 4-метилпиразол. Данные представлены как 25% и 75% перцентили (границы коробки), максимальное и минимальное значение (верхняя и нижняя граница усов), выпадающие точки обозначены отдельно стоящими кружками. *CH* — статистически незначимо, *p* — *p-value* (критерий Манна-Уитни).

Исходя из повышенного уровня мРНК *ALDH2*, логично предположить увеличение количества белка, и как следствие, общей ферментативной активности альдегиддегидрогеназы 2 в мозге мышей.

Для оценки влияния альфа-липоевой кислоты на активность альдегиддегидрогеназы 2, мы отобрали мозг у мышей через 90 минут после введения 4-метилпиразола вместе с альфа-липоевой кислотой и без нее. Альдегиддегидрогеназа 2 единственная из митохондриальных ферментов, окисляющих ФА, в связи с чем мы отделили митохондриальную фракцию белков, и спектрофотометрически оценили её активность через кинетику накопления НАДН с ФА в качестве субстрата. Действительно, активность альдегиддегидрогеназы 2 в среднем была в полтора раза выше в мозге мышей, которым вводили альфа-липоевую кислоту (Рисунок 3.16.).

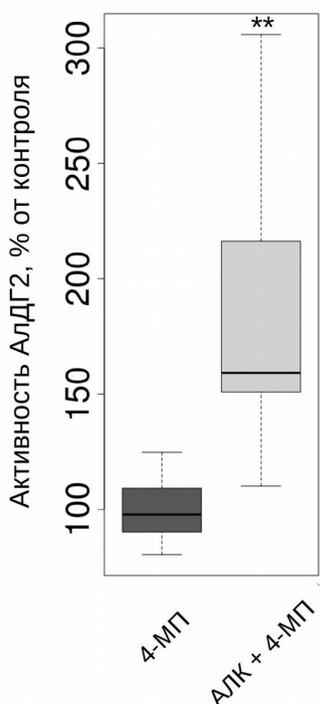


Рисунок 3.16. Относительная активность альдегиддегидрогеназы 2 в митохондриальной фракции белков мозга мышей, обработанных 4-метилпиразолом в сочетании с альфа-липоевой кислотой или без нее. Данные представлены как отношение активности фермента в опытной группе, нормализованное на общее количество белка (мг), к контрольной группе и выражено в процентах. Границы коробки являются 25% и 75% перцентилими, максимальное и минимальное значение - верхняя и нижняя граница усов, соответственно. ** *p-value* < 0.01 (критерий Манна-Уитни). 4-МП — 4-метилпиразол, АЛК — альфа-липоевая кислота, АлДГ2 — альдегиддегидрогеназа 2.

Измерение активности формальдегиддегидрогеназы (алкогольдегидрогеназы III класса), второго важного фермента для окисления ФА, во фракции цитоплазматических белков целого мозга мыши показало увеличение активности фермента у группы мышей, обработанных АЛК (Рисунок 3.17.).

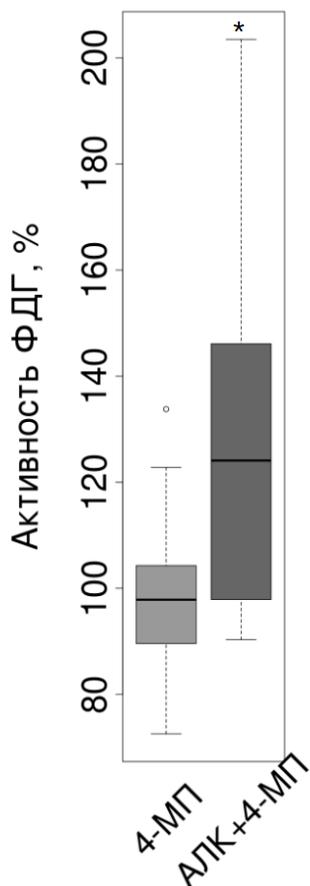


Рисунок 3.17. Относительная активность формальдегиддегидрогеназы (алкогольдегидрогеназы III класса) во фракции цитоплазматических белков мозга мышей, обработанных 4-метилпиразолом в сочетании с альфа-липоевой кислотой или без нее. Данные представлены как отношение активности фермента в опытной группе, нормализованное на общее количество белка (мг), к контрольной группе и выражено в процентах. Границы коробки являются 25% и 75% перцентилями, максимальное и минимальное значение - верхняя и нижняя граница усов, соответственно, * p -value < 0.05 (критерий Манна-Уитни). 4-МП — 4-метилпиразол, АЛК — альфа-липоевая кислота, ФДГ - формальдегиддегидрогеназа.

Измерение концентрации восстановленного глутатиона в мозге мышей, которым вводили альфа-липоевую кислоту, подтвердило ее способность смещать баланс глутатиона в клетке в сторону его восстановленной формы, которая необходима для окисления ФА через алкогольдегидрогеназу III класса (Рисунок 3.18.). Таким образом, в основе эффекта альфа-липоевой кислоты на концентрацию ФА лежат два фактора: активация альдегиддегидрогеназы 2 через увеличение транскрипции гена *ALDH2* и рост концентрации восстановленного глутатиона.

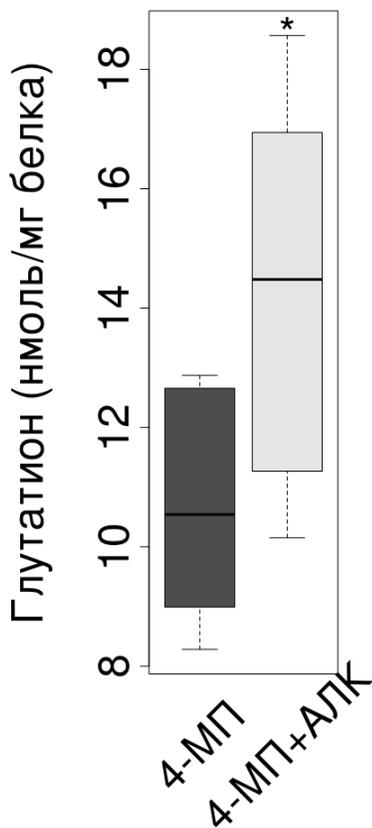


Рисунок 3.18. Концентрация глутатиона в митохондриальной фракции клеток целого мозга, обработанных 4-метилпиразолом в качестве контроля и альфа-липоевой кислотой с 4-метилпиразолом. Данные представлены как отношение концентрация глутатиона в нмоль, нормализованное на общее количество белка (мг) в образце. Границы коробки являются 25% и 75% перцентилями, максимальное и минимальное значение - верхняя и нижняя граница усов, соответственно. * p -value < 0.05 (t -тест Стьюдента). 4-MП — 4-метилпиразол, АЛК — альфа-липоевая кислота.

Наряду с мышьями альфа-липоевая кислота снижает концентрацию ФА в крови человека. В качестве источника эндогенного метанола у людей мы использовали пектиновые капсулы. Помимо пектина добровольцы принимали капсулы с рацемической смесью альфа-липоевой кислоты (600 или 2400 мг) или ее стабилизированную R-форму (480 мг). До приема капсул и 150 минут после у людей отбирали 7 мл крови, 2 из которых использовали для отделения сыворотки, из оставшихся 5 мл выделяли лейкоциты. Из сыворотки высаживали белки и в полученной насадочной жидкости измеряли ФА методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Согласно полученным данным, альфа-липоевая кислота снижает уровень ФА в крови людей (Рисунок 3.19.). Одновременный прием капсул альфа-липоевой кислоты и пектина был необходим для увеличения концентрации эндогенного метанола и ФА, чтобы преодолеть пределы обнаружения веществ.

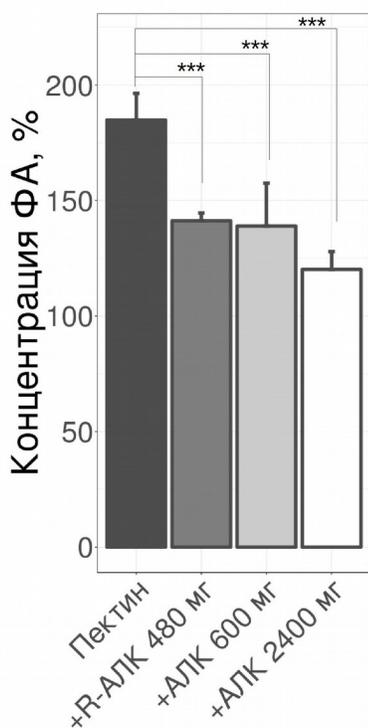


Рисунок 3.19. Концентрация ФА в сыворотке крови добровольцев, принимавших пектин (5,2 г) с капсулами альфа-липоевой кислоты (600 или 2400 мг) или стабилизированной r-формой альфа-липоевой кислоты (480 мг). Данные представлены как отношение концентрации ФА в опытных группах к контрольной группе и выражены в процентах. *** p -value < 0.001 (критерий Манна-Уитни). Данные представлены как среднее со стандартным отклонением. 4-МП — 4-метилпиразол, АЛК — альфа-липоевая кислота.

кОТ-ПЦР ключевых генов метаболизма метанола в лейкоцитах добровольцев выявила увеличение мРНК гена *ALDH2* в ответ на прием альфа-липоевой кислоты (Рисунок 3.20.). Таким образом, способность альфа-липоевой кислоты снижать концентрацию ФА через активацию *ALDH2* консервативна между человеком и мышью.

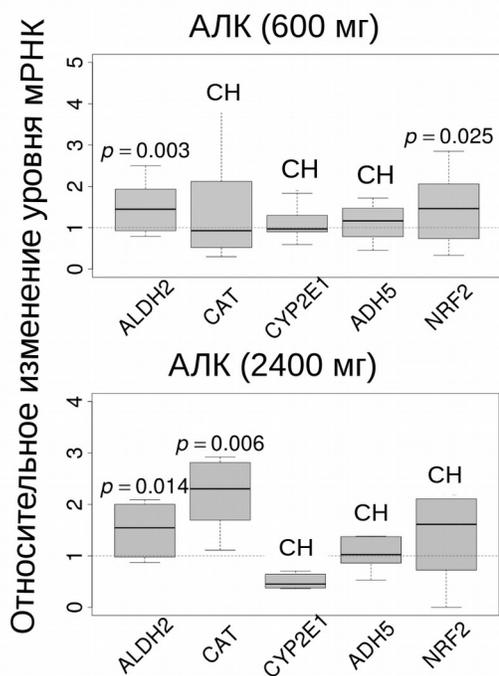


Рисунок 3.20. Относительное количество мРНК генов *ALDH2*, *CAT*, *CYP2E1*, *ADH5* и *NFE2L2* (*NRF2*) в лейкоцитах добровольцев на 150 минуте после приема капсул пектина (5.2 г) с 600 мг альфа-липоевой кислоты (верхний рисунок) и капсул пектина (5.2 г) с 2400 мг альфа-липоевой кислоты (нижний рисунок), нормированное на значение до приема капсул. Данные представлены как 25% и 75% перцентили (границы коробки), максимальное и минимальное значение (верхняя и нижняя граница усов), выпадающие точки обозначены отдельно стоящими кружками. CH — статистически незначимо, АЛК — альфа-липоевая кислота. p — p -value (критерий Манна-Уитни).

4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Вклад пектинметилэстеразы растительной пищи в образование метанола и ФА

У человека и модельных организмов при переваривании необработанной растительной пищи образуется метанол (Dorokhov et al., 2012; Lindinger et al., 1997), однако точный механизм его образования был неизвестен. Согласно одной из основных гипотез, метанол синтезируется за счет гидролиза сложноэфирных связей метилированного пектина. Полученные данные *in vitro* и *in vivo*, подтверждают ключевую роль метильных групп пектина и ПМЭ в образовании метанола: в случае слабометилированного пектина (пектин (ПМЭ-), 6,7%) уровень метанола был значительно ниже, как при инкубации в пробирке, так и в организме мышей, чем у сильнометилированного пектина (пектин (ПМЭ+), 90%). Интересно, что количество метильных групп между двумя видами пектинов отличается в 12 раз, что соответствует разнице в концентрациях метанола, образующихся *in vitro* при термической обработке (8 раз) и *in vivo* при переваривании в желудочно-кишечном тракте мышей (10 раз). Более того, максимальный прирост концентрации метанола у добровольцев (50 мкМ) и мышей (450 мкМ), принимавших пектин, соотносятся как 1:9, что соответствует отношению доз пектина (1:8,75), которые вводили мышам (~0,7 г/кг) и принимали добровольцы (~0,08 г/кг).

Кинетика накопления метанола сильно отличается между человеком и мышью. В экспериментах с мышами введение метилированного пектина дает пик концентрации метанола уже на 10 минуте с последующим градиентным падением. В то время как после приема метилированного пектина добровольцами концентрация метанола медленно нарастает в течение 2 часов. Подобные отличия можно объяснить как разницей в методике введения пектина, так и различиями в физиологии между грызунами и людьми. Оптимальный pH для работы ПМЭ сильно отличается среди бактерий, грибов и растений, но находится в пределах значений от 4 до 9 (Jayani et al., 2005). В то же время, pH желудочного сока человека, измеренный натощак, составляет 1.7 (Dressman et al., 1990). У мышей pH желудочного сока значительно выше — 4.0 (McConnell et al., 2008). Попадая в кислую среду желудочного сока человека, растительная ПМЭ теряет активность, и, вероятно, восстанавливает ее в кишечнике, где pH ближе к оптимуму ее работы. В то же время, у мыши она, по-видимому, сохраняет свою активность на протяжении всего желудочно-кишечного

тракта и способна генерировать метанол в желудке, что объясняет значительное увеличение концентрации метанола в крови мышей сразу после введения метилированного пектина в желудок.

Помимо растительной ПМЭ, присутствующей в капсулах с пектином, вклад в образование метанола могут вносить бактериальные ПМЭ. Было показано, что инкубация бактерий из микрофлоры человека с метилированным пектином приводит к образованию метанола (Siragusa et al., 1988). С другой стороны, в метагеноме людей закодировано множество ПМЭ, в том числе, в геноме основных представителей микрофлоры кишечника. Аналогичная картина наблюдается в случае с микрофлорой мышей. Видовой состав бактерий микрофлоры кишечника мышей был сопоставлен со списком бактерий, в геноме которых согласно базе данных KEGG закодирована ПМЭ. В результате была выделена обширная группа бактерий, кодирующих ПМЭ. Оказалось, что среди них представлены виды, известные своей способностью перерабатывать растительный пектин, например, *Prevotella ruminicola*, *Clostridium sp.* и *Faecalibacterium prausnitzii*. В Таблице 4.1. представлен список наиболее представленных представителей микрофлоры кишечника мышей, в геноме которых закодирована ПМЭ.

Таблица 4.1. Список видов бактерий микрофлоры кишечника мыши, в геноме которых закодирована ПМЭ, с указанием их относительной встречаемости в микрофлоре, выраженной в процентах. Данные по составу микрофлоры взяты из базы данных GIGA (<http://gigadb.org>), полученные в результате анализа микрофлоры кишечника 187 мышей, относительная встречаемость рассчитывалась как среднее для всех мышей. МГБ – метилэстераза глутамата белков.

Вид бактерии	%
<i>Escherichia coli</i>	3.6E-02
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.6E-02
<i>Helicobacter hepaticus</i>	1.2E-02
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3.3E-04
<i>Shigella flexneri</i>	3.3E-04
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2.2E-04
<i>Citrobacter koseri</i>	1.8E-04
<i>Salmonella enterica</i>	1.1E-04

<i>Shigella sonnei</i>	1.0E-04
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	7.7E-05
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	7.0E-05
<i>Oxalobacter formigenes</i>	6.6E-05
<i>Escherichia fergusonii</i>	6.3E-05
<i>Shigella dysenteriae</i>	4.9E-05
<i>Acinetobacter pittii</i>	4.2E-05
<i>Yersinia pestis</i>	1.5E-05
<i>Shigella boydii</i>	1.2E-05
<i>Enterobacter aerogenes</i>	9.8E-06
<i>Acinetobacter junii</i>	8.9E-06
<i>Haemophilus parasuis</i>	7.0E-06
<i>Proteus mirabilis</i>	4.8E-06
<i>Campylobacter jejuni</i>	1.7E-06

Таким образом, метанол образуется за счет гидролиза сложноэфирных связей пектина с метанолом при участии растительной ПМЭ, и, возможно, бактериальной ПМЭ, и кинетика его образования отличается между мышью и человеком.

4.2. Конкурентное ингибирование алкогольдегидрогеназы класса 1 этанолом и 4-метилпиразолом приводит к накоплению метанола и ФА в организме человека и животных.

Клетки млекопитающих постоянно окисляют эндогенный метанол, однако у здоровых животных и людей натощак детектируется базовый уровень метанола. Метанол постоянно образуется как побочный продукт жизнедеятельности клеток млекопитающих и бактерий микрофлоры, на что указывает его присутствие в концентрации 30-50 мкМ в контрольных группах. Данное предположение подтверждают данные по ингибированию 4-метилпиразолом алкогольдегидрогеназ I класса у грызунов, при котором значительно увеличились концентрации метанола, ФА и этанола. Микрофлора рассматривается в качестве одного из ключевых продуцентов метанола. Известно, что она участвует в образовании значительной части эндогенного этанола, обнаруживаемого наравне с метанолом в организме млекопитающих. Так, содержание

этанол в крови, собранной из воротной вены мышей без микрофлоры (18 мкМ), значительно меньше, чем у контрольных мышей (51 мкМ) (Krebs and Perkins, 1970). Введение мышам антибиотиков также снижало концентрацию этанола во всех отделах желудочно-кишечного тракта от желудка до прямого кишечника (Krebs and Perkins, 1970).

Введение 4-метилпиразола людям приводило к увеличению концентрации метанола и этанола в их крови (Sarkola and Eriksson, 2001), что согласуется с данными, полученными нами на добровольцах, принимавших этанол - конкурентный ингибитор метаболизма метанола.

Таким образом, очевидно присутствие эндогенных источников метанола и этанола в организме млекопитающих. Тогда как доказана роль микрофлоры в образовании значительной части эндогенного этанола, отсутствуют данные про источники эндогенного метанола. Выдвигались гипотезы об участии печени в синтезе метанола, однако они не подтвердились в наших экспериментах на изолированной печени. Падение концентрации метанола до значений ниже предела обнаружения прибора в перфузате изолированной печени так же говорит о возможном незначительном вкладе метаболических процессов в образование эндогенного метанола.

По аналогии с этанолом, микрофлора рассматривалась в качестве эндогенного источника метанола. Падение концентрации метанола в крови крыс при удалении участка желудочно-кишечного тракта, наблюдаемое в наших экспериментах, указывает на участие микрофлоры в образовании эндогенного метанола.

Согласно базе данных KEGG, на данный момент описано 10 реакций, протекающих с образованием метанола у бактерий (Таблица 4.2.).

Таблица 4.2. Список реакций, катализируемых бактериальными ферментами, с образованием метанола в качестве продукта. АСБ – ацил-содержащий белок, ММО – метанмонооксигеназа, ПМЭ – пектинметилэстераза. В таблицу не вошли реакции с образованием метанола, катализируемые в особых условиях окружающей среды.

Идентификатор	Субстраты	Продукты	Фермент
KEGG			
R00614	Формальдегид, H ₂ O	Метанол, муравьиная	Формальдегиддисмутаза [ЕС:

		кислота	1.2.98.1]
R01142	Метан, O ₂ , НАДН	Метанол, НАД ⁺ , H ₂ O	Растворимая ММО, [ЕС:1.14.13.25]
R01144	4-метилоксалоацетат, H ₂ O	Метанол, оксалоацетат	4-метилоксалоацетат эстераза [ЕС: 3.1.1.44]
R02362	Пектин, H ₂ O	Пектат, метанол	ПМЭ [ЕС:3.1.1.11]
R02624	Эфир глутамата белков с метанолом, H ₂ O	Метанол, глутамат	Метилэстераза глутамата белков [ЕС: 3.1.1.61]
R04280	3-О-метилгалловая кислота, O ₂	Метанол, 2-пирон-4,6-дикарбоксилловая кислота	Диоксигеназа галловой кислоты [ЕС: 1.13.11.8]
R09061	Хлорофилид, H ₂ O	Метанол, 8-Этил-12-метил-3-винилбакетриохлорофилид d, CO ₂	Хлорофилидгидролаза [ЕС: 3.1.1.100]
R09518	Метан, хинол, O ₂	Метанол, хинон, H ₂ O	Мембранная ММО [ЕС: 1.14.18.3]
R09725	Метилвый эфир пимелоила-[АСБ*], H ₂ O	Метанол, пимелоил-[АСБ*]	ВіоН [ЕС: 3.1.1.85]
R10705	Метилацетат, H ₂ O	Метанол, ацетат	Метилацетат гидролаза [ЕС: 3.1.1.-]

Поиск бактерий, в чьих геномах предсказаны гены, кодирующие приведенные в таблице ферменты, показал, что в метагеноме мышей, помимо ПМЭ, закодированы диоксигеназа галловой кислоты, метилэстераза глутамата белков и фермент биосинтеза биотина ВіоН. Диоксигеназа галловой кислоты согласно биоинформатическому анализу присутствует только в геноме *Rhodopseudomonas palustris*, тогда как два других гена широко представлены в микрофлоре кишечника мышей (Таблица 4.3.).

Таблица 4.3. Список видов бактерий из микрофлоры кишечника мышей, в чьих геномах закодированы ферменты биосинтеза биотина BioH и метилэстеразы глутамата белков (МГБ), с указанием их относительной встречаемости в микрофлоре, выраженной в процентах. Данные по составу микрофлоры взяты из базы данных GIGA (<http://gigadb.org>), полученные в результате анализа микрофлоры кишечника 187 мышей, относительная встречаемость рассчитывалась как среднее для всех мышей. МГБ – метилэстераза глутамата белков.

Вид бактерии	BioH (%)	МГБ (%)
<i>Burkholderiales bacterium</i>	-	2E-02
<i>Escherichia coli</i>	4E-02	4E-02
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3E-02	3E-02
<i>Helicobacter hepaticus</i>	1E-02	1E-02
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3E-04	3E-04
<i>Shigella flexneri</i>	3E-04	3E-04
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2E-04	-
<i>Citrobacter koseri</i>	2E-04	2E-04
<i>Salmonella enterica</i>	1E-04	1E-04
<i>Shigella sonnei</i>	1E-04	1E-04
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	8E-05	-
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	7E-05	-
<i>Oxalobacter formigenes</i>	7E-05	-
<i>Escherichia fergusonii</i>	6E-05	6E-05
<i>Shigella dysenteriae</i>	5E-05	-
<i>Acinetobacter pittii</i>	4E-05	-
<i>Yersinia pestis</i>	1E-05	1E-05

<i>Shigella boydii</i>	1E-05	1E-05
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1E-05	1E-05
<i>Acinetobacter junii</i>	9E-06	-
<i>Haemophilus parasuis</i>	7E-06	-
<i>Proteus mirabilis</i>	5E-06	5E-06
<i>Campylobacter jejuni</i>	2E-06	2E-06

Четыре вида бактерий (*Burkholderiales bacterium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Helicobacter hepaticus*), потенциально являющихся продуцентами метанола, встречаются в микрофлоре кишечника мышей гораздо чаще остальных, что дает возможность предположить их ключевую роль в продукции эндогенного метанола.

4.3. Метанол участвует в регуляции экспрессии генов мозга и печени мышей.

Долгое время метанол рассматривался как метаболический мусор, в связи с чем его функция как потенциальной сигнальной молекулы, способной влиять на экспрессию генов, не изучалась. Полученные нами данные по полногеномному изменению уровня транскриптов на микроматрицах, выявили влияние метанола на экспрессию большой группы генов, кодирующие белки с разнообразными функциями. Так, внутрибрюшинное введение метанола по сравнению с контролем увеличивает и уменьшает количество транскриптов 780 и 868 генов, соответственно.

Интересно, что способ обработки мышей метанолом сильно влияет на результат эксперимента. Так, группа генов, изменяющая уровень мРНК при ингаляции парами метанола, только на 6% перекрывается с генами, которые отвечают на введение метанола внутрибрюшинно. Для сравнения, эффект от внутрибрюшинного введения этанола на уровень транскриптов в мозге мышей перекрывается с эффектом от введения метанола на 40%, что почти в 7 раз больше. Полученные данные можно объяснить сильными различиями в фармакокинетике метанола в зависимости от способа обработки. При обработке парами метанола, его уровень в крови приматов

практически не изменяется (Burbacher et al., 2004), а при обработке парами ФА, основная его часть остается в слизистых оболочках дыхательных путей крыс (Lai et al., 2016).

Как результат повышения концентрации метанола и ФА в крови при введении 4-метилпиразола и метанола, в мозге мышей особенно выделяется увеличение уровня мРНК генов, кодирующих рибосомальные белки, субъединицы протеасомы и белки сигнального пути протеолиза при убиквитинировании. Подобный эффект является маркером протеолитического стресса в мозге мышей, вызванного метанолом и продуктами его окисления. Полученные данные согласуются с тем, что ФА приводит к массовому протеолизу белков через убиквитинирование (Ortega-Atienza et al., 2016). Более того, ФА провоцирует агрегацию белков, в том числе ключевого участника патогенеза БА – тау-белка (Lu et al., 2013; Nie et al., 2007).

Неожиданно было обнаружено увеличение уровня мРНК ряда генов, связанных с развитием БА, включая ключевых игроков – *APOE* и *PSENEN*, в ответ на введение метанола и 4-метилпиразола. На ряду с тем фактом, что у пациентов с БА повышенное содержание ФА в крови и мозге, полученные данные указывают на возможный вклад ФА в развитие БА не только за счет его протеотоксических свойств, но и за счет влияния на экспрессию генов.

Этанол, как и 4-метилпиразол, ингибирует процесс окисления метанола в ФА, что приводит к накоплению первого. В связи с чем сложно различить эффекты этанола и метанола при работе с животными. Для половины генов, уровень мРНК которых увеличивается в ответ на этанол, обнаружен такой же эффект при введении метанола. 90% из генов, отвечающих на введение и этанола, и метанола, точно так же реагируют на 4-метилпиразол. Вместе эти данные показывают, что некоторые эффекты, которые мы наблюдаем в экспериментах на животных с участием 4-метилпиразола и этанола, могут быть опосредованы увеличением концентрации метанола в крови, а не прямым их действием.

Уровень мРНК 90% генов в мозге мышей, меняющийся при введении 4-метилпиразола, меняется в ту же сторону при введении этанола и метанола. В то время как этанол и метанол, обладая похожими физико-химическими свойствами, вполне могут одинаково воздействовать на метаболические и сигнальные пути клетки, судьба 4-метилпиразола разительно отличается. В отличие от коротких спиртов, он не является эндогенной молекулой, и его выведение из организма

проходит в основном через путь катаболизма ксенобиотиков в печени и почках животных (Feierman and Cederbaum, 1985; McMartin et al., 2012). Пиразол не способен проходить через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) (Sonoro et al., 2016), тем не менее, после его введения мы наблюдаем изменения в экспрессии генов в мозге мышей, и они в значительной степени перекрываются с изменениями, вызванными введением метанола и этанола. Являясь ингибитором алкогольдегидрогеназы I класса, 4-метилпиразол повышает уровень метанола и этанола в крови мышей за счет работы его эндогенных источников (Komarova et al., 2014). Вероятно, эффект 4-метилпиразола на уровень мРНК генов мозга мышей связан с повышением концентрации метанола, этанола и продуктов их метаболизма в крови, способных проходить через ГЭБ.

Верификация данных, полученных на микроматрицах, методом кОТ-ПЦР на образцах мозга мышей, обработанных парами метанола, выявила высокую корреляцию между генами с дифференциальным изменением уровня мРНК. Таким образом, данные, полученные на микроматрицах хорошо отражают изменение экспрессии генов в проведенных экспериментах.

Интерес составляет не только влияние метанола на клетки мозга, но и на печень, что связано с высокой частотой встречаемости патологий печени среди алкоголиков. Разовое введение этанола приводит к повышению содержания метанола в крови людей и грызунов. К сожалению, данных по концентрации метанола в крови у алкоголиков на текущий момент не опубликовано. Тем не менее, вполне вероятно, что у них повышен уровень метанола и токсичных продуктов его метаболизма, и за счет протеотоксических и генотоксических свойств, они вносят вклад в развитие цирроза печени наряду с этанолом и продуктами его окисления. С целью определить эффекты метанола на метаболизм метанола в печени, методом кОТ-ПЦР были получены данные по влиянию повышенного содержания метанола на основные гены пути метаболизма коротких спиртов в печени, чей уровень мРНК изменился в мозге. Оказалось, что как и при введении метанола, 4-метилпиразол изменяет соотношение транскриптов в печени мышей так, чтобы снизить концентрацию токсичных альдегидов. В мозге слишком низкая экспрессия алкогольдегидрогеназы I класса не позволила оценить эффекта метанола на нее. В печени видно значительное снижение уровня ее мРНК и одновременное увеличение мРНК альдегиддегидрогеназы 2 и 1, которое наблюдалось и в мозге. Сложно различить эффекты от эндогенных этанола и метанола при введении 4-метилпиразола в связи с накоплением обоих

спиртов в крови мышей. Тем не менее, согласно литературным данным, этанол не влияет на уровень мРНК *ADH1*, *ALDH2* и *ALDH1* (Chen et al., 2011), а с другой стороны, введение метанола увеличивает уровень мРНК *ALDH2* и *ALDH1* в мозге мышей. Вместе эти данные указывают на то, что метанол ответственен за переформатирование метаболизма коротких спиртов на уровне экспрессии генов при введении 4-метилпиразола. Подобным способом, по-видимому, клетки печени стараются избежать повышенного содержания токсичного ФА.

4.4. Эндогенный антиоксидант альфа-липоевая кислота участвует в поддержании низкого уровня ФА у млекопитающих

АЛК считается универсальным антиоксидантом за счет высокого окислительно-восстановительного потенциала и амфифильной структуре. Полученные данные открывают новые свойства АЛК в организме млекопитающих – поддержание низкого уровня ФА у млекопитающих. Так, ее введение снижает уровень ФА в крови человека и мыши, используя схожие механизмы действия. Повышение активности альдегиддегидрогеназы 2 при введении АЛК были ранее показаны на крысах и людях (Chen et al., 2008; Li et al., 2016). Тем не менее, оставался неясным механизм действия: является ли АЛК аллостерическим регулятором альдегиддегидрогеназы 2, повышает стабильность белка, кодирующей ее мРНК или увеличивает экспрессию гена. Полученные данные по изменению уровня мРНК генов пути метаболизма коротких спиртов в ответ на введение АЛК выявили повышение уровня мРНК гена *ALDH2* в лейкоцитах человека и в мозге мышей, и в частности, в гиппокампе, но не в селезенке, печени, почках и сердце мышей. Более того, измерение активности альдегиддегидрогеназы 2 во фракции митохондриальных белков мозга мышей, обработанных АЛК, выявило ее значительное увеличение по сравнению с контролем.

Причина столь избирательного действия АЛК на альдегиддегидрогеназу 2 в мозге мышей остается неясной. Основная доля экзогенно поступающей АЛК распределяется по почкам и печени, однако в обоих органах уровень мРНК генов интереса не отличается от контрольных значений. Несмотря на то, что экзогенная АЛК не проходит ГЭБ или проходит в очень невысоких концентрациях (Chng et al., 2009; Harrison and McCormick, 1974), несомненно ее положительное влияние на клетки мозга. Так, АЛК увеличивает уровень нейротропного фактора BDNF,

восстанавливает уровень каспазы 3, токсичных альдегидов и NO в мозге в условиях ишемии (He et al., 2012). Введение АЛК снижает уровень окислительного стресса, увеличивая содержание основного антиоксиданта клеток - глутатиона и ферментов его синтеза (Arivazhagan et al., 2002; Dixit et al., 2011; Mehrotra and Sandhir, 2014), что согласуется с полученными нами данными. Эффекты АЛК в мозге можно объяснить способностью ее метаболитов, в том числе ДГЛК, проходить ГЭБ или активизацией сигнальных путей на границе с ГЭБ. Анализ транскриптов из мозга мышей, которым вводили АЛК или контрольный раствор, выявил активацию нескольких сигнальных путей, включая mTOR и PI3K-Akt, что согласуется с ранее опубликованными данными. Согласно нашим данным, АЛК повышает уровень двух транскрипционных факторов, связывающих участок промотора гена *ALDH2* (-2000...0 выше старта транскрипции) *in vitro*, взятых из базы данных UniPROBE. Первый транскрипционный фактор EGR1, второй – SMAD3. Предположительно, они могут участвовать в регуляции транскрипции *ALDH2* в мозге при введении АЛК. Важно отметить, что полученные нами данные говорят об отсутствии эффекта АЛК на сигнальный путь основного сенсора окислительного стресса — транскрипционного фактора NRF2. Уровень его мРНК не изменяется ни в одном из отделов головного мозга при введении АЛК. Данные по изменению экспрессии генов мозга мыши, полученные на микроматрицах, не выявили изменения в уровне транскриптов-мишеней NRF2. Несмотря на антиоксидантные свойства АЛК, по-видимому, эффект АЛК на клетки мозга мышей опосредуется другими сигнальными путями, такими, как mTOR/S6K и PI3K-Akt, но не NRF2/Keap1.

Отличие АЛК от остальных известных регуляторов метаболизма метанола и ФА состоит в том, что она синтезируется в организме животных и является физиологической молекулой. В связи с чем, нарушение ее метаболизма потенциально также может влиять на окисление эндогенного метанола.

Таким образом, эндогенный антиоксидант альфа-липоевая кислота участвует в поддержании низкого уровня ФА у млекопитающих, контролируя активность альдегиддегидрогеназы 2 через увеличение уровня мРНК кодирующего ее гена.

5. ВЫВОДЫ

1. Пектинметилэстераза растительной пищи ответственна за образование метанола и ФА в организме животных и человека.
2. Конкурентное ингибирование алкогольдегидрогеназ I класса этанолом и 4-метилпиразолом приводит к накоплению метанола и ФА в организме человека и животных.
3. Повышение концентрации метаболического метанола и ФА в сыворотке крови человека и млекопитающих сопровождается активизацией кластера генов (например, *ALDH2*, *ALDH1*, *CYP2E1*), ответственных за метаболизм коротких спиртов.
4. Эндогенный антиоксидант альфа-липоевая кислота участвует в поддержании низкого уровня ФА у млекопитающих, контролируя активность альдегиддегидрогеназы 2.

6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aas, P.A., Otterlei, M., Falnes, P.O., Vagbo, C.B., Skorpen, F., Akbari, M., Sundheim, O., Bjoras, M., Slupphaug, G., Seeberg, E., Krokan, H.E., 2003. Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature* 421, 859–863. doi:10.1038/nature01363
- Acosta, G., Hasenkamp, W., Daunais, J.B., Friedman, D.P., Grant, K.A., Hemby, S.E., 2010. Ethanol self-administration modulation of NMDA receptor subunit and related synaptic protein mRNA expression in prefrontal cortical fields in cynomolgus monkeys. *Brain Res.* 1318, 144–154. doi:10.1016/j.brainres.2009.12.050
- Adas, F., Berthou, F., Picart, D., Lozac'h, P., Beaugé, F., Amet, Y., 1998. Involvement of cytochrome P450 2E1 in the (omega-1)-hydroxylation of oleic acid in human and rat liver microsomes. *J. Lipid Res.* 39, 1210–1219.
- Alfonso-Loeches, S., Pascual-Lucas, M., Blanco, A.M., Sanchez-Vera, I., Guerri, C., 2010. Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 8285–8295. doi:10.1523/JNEUROSCI.0976-10.2010
- Amet, Y., Berthou, F., Goasduff, T., Salaun, J.P., Le Breton, L., Menez, J.F., 1994. Evidence that cytochrome P450 2E1 is involved in the (omega-1)-hydroxylation of lauric acid in rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 1168–1174.
- Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E., 2001. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 58, 737–747.
- Arivazhagan, P., Shila, S., Kumaran, S., Panneerselvam, C., 2002. Effect of DL-alpha-lipoic acid on the status of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in various brain regions of aged rats. *Exp. Gerontol.* 37, 803–811.
- Avadhani, N.G., Sangar, M.C., Bansal, S., Bajpai, P., 2011. Bimodal targeting of cytochrome P450s to endoplasmic reticulum and mitochondria: the concept of chimeric signals. *FEBS J.* 278, 4218–4229. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08356.x

- Badger, T.M., Huang, J., Ronis, M., Lumpkin, C.K., 1993. Induction of cytochrome P450 2E1 during chronic ethanol exposure occurs via transcription of the CYP 2E1 gene when blood alcohol concentrations are high. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190, 780–785. doi:10.1006/bbrc.1993.1117
- Baggott, J.E., Tamura, T., 2015. Folate-Dependent Purine Nucleotide Biosynthesis in Humans. *Adv. Nutr. Bethesda Md* 6, 564–571. doi:10.3945/an.115.008300
- Bai, J., Cederbaum, A.I., 2006. Overexpression of CYP2E1 in mitochondria sensitizes HepG2 cells to the toxicity caused by depletion of glutathione. *J. Biol. Chem.* 281, 5128–5136. doi:10.1074/jbc.M510484200
- Barker, D.F., Campbell, A.M., 1980. Use of bio-lac fusion strains to study regulation of biotin biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 143, 789–800.
- Bast, A., Haenen, G.R., 1988. Interplay between lipoic acid and glutathione in the protection against microsomal lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 963, 558–561.
- Batterman, S.A., Franzblau, A., 1997a. Time-resolved cutaneous absorption and permeation rates of methanol in human volunteers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 70, 341–351. doi:10.1007/s004200050228
- Batterman, S.A., Franzblau, A., 1997b. Time-resolved cutaneous absorption and permeation rates of methanol in human volunteers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 70, 341–351.
- Batterman, S.A., Franzblau, A., D’Arcy, J.B., Sargent, N.E., Gross, K.B., Schreck, R.M., 1998. Breath, urine, and blood measurements as biological exposure indices of short-term inhalation exposure to methanol. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 71, 325–335.
- Bell-Parikh, L.C., Guengerich, F.P., 1999. Kinetics of Cytochrome P450 2E1-Catalyzed Oxidation of Ethanol to Acetic Acid via Acetaldehyde. *J. Biol. Chem.* 274, 23833–23840. doi:10.1074/jbc.274.34.23833
- Bierhaus, A., Chevion, S., Chevion, M., Hofmann, M., Quehenberger, P., Illmer, T., Luther, T., Berentshtein, E., Tritschler, H., Müller, M., Wahl, P., Ziegler, R., Nawroth, P.P., 1997. Advanced

- glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes* 46, 1481–1490.
- Bitar, M.S., Ayed, A.K., Abdel-Halim, S.M., Isenovic, E.R., Al-Mulla, F., 2010. Inflammation and apoptosis in aortic tissues of aged type II diabetes: amelioration with alpha-lipoic acid through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt- dependent mechanism. *Life Sci.* 86, 844–853. doi:10.1016/j.lfs.2010.03.019
- Blumenthal, D.C., Kassner, R.J., 1979. Azide binding to the cytochrome c ferric heme octapeptide. A model for anion binding to the active site of high spin ferric heme proteins. *J. Biol. Chem.* 254, 9617–9620.
- Bosron, W.F., Li, T.K., Däfeldecker, W.P., Vallee, B.L., 1979. Human liver pi-alcohol dehydrogenase: kinetic and molecular properties. *Biochemistry (Mosc.)* 18, 1101–1105.
- Bosron, W.F., Magnes, L.J., Li, T.K., 1983. Kinetic and electrophoretic properties of native and recombined isoenzymes of human liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry (Mosc.)* 22, 1852–1857.
- Bower, S., Perkins, J.B., Yocum, R.R., Howitt, C.L., Rahaim, P., Pero, J., 1996. Cloning, sequencing, and characterization of the *Bacillus subtilis* biotin biosynthetic operon. *J. Bacteriol.* 178, 4122–4130.
- Bradford, B.U., Forman, D.T., Thurman, R.G., 1993a. 4-Methylpyrazole inhibits fatty acyl coenzyme synthetase and diminishes catalase-dependent alcohol metabolism: has the contribution of alcohol dehydrogenase to alcohol metabolism been previously overestimated? *Mol. Pharmacol.* 43, 115–119.
- Bradford, B.U., Seed, C.B., Handler, J.A., Forman, D.T., Thurman, R.G., 1993b. Evidence that catalase is a major pathway of ethanol oxidation in vivo: dose-response studies in deer mice using methanol as a selective substrate. *Arch. Biochem. Biophys.* 303, 172–176. doi:10.1006/abbi.1993.1269
- Brown, C.J., Zhang, L., Edenberg, H.J., 1994. Tissue-specific differences in the expression of the human ADH2 alcohol dehydrogenase gene and in binding of factors to cis-acting elements in its promoter. *DNA Cell Biol.* 13, 235–247.

- Burbacher, T.M., Shen, D.D., Lalovic, B., Grant, K.S., Sheppard, L., Damian, D., Ellis, S., Liberato, N., 2004. Chronic maternal methanol inhalation in nonhuman primates (*Macaca fascicularis*): Exposure and toxicokinetics prior to and during pregnancy. *Neurotoxicol. Teratol.* 26, 201–221. doi:10.1016/j.ntt.2003.10.003
- Shi C, Zhou X, Zhang J, Wang J, Xie H, Wu Z., 2016. α -Lipoic acid protects against the cytotoxicity and oxidative stress induced by cadmium in HepG2 cells through regeneration of glutathione by glutathione reductase via Nrf2/ARE signaling pathway. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 45, 274–281. doi:10.1016/j.etap.2016.06.003
- Camilo, E., Zimmerman, J., Mason, J.B., Golner, B., Russell, R., Selhub, J., Rosenberg, I.H., 1996. Folate synthesized by bacteria in the human upper small intestine is assimilated by the host. *Gastroenterology* 110, 991–998.
- Caro, A.A., Cederbaum, A.I., 2004. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 27–42. doi:10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121704
- Cederbaum, A.I., 2013. Nrf2 and antioxidant defense against CYP2E1 toxicity. *Subcell. Biochem.* 67, 105–130. doi:10.1007/978-94-007-5881-0_2
- Cederbaum, A.I., 2012a. CYP2E1 potentiates toxicity in obesity and after chronic ethanol treatment. *Drug Metabol. Drug Interact.* 27, 125–144. doi:10.1515/dmdi-2012-0014
- Cederbaum, A.I., 2012b. Alcohol Metabolism. *Clin. Liver Dis.* 16, 667–685. doi:10.1016/j.cld.2012.08.002
- Cederbaum, A.I., 2006. CYP2E1--biochemical and toxicological aspects and role in alcohol-induced liver injury. *Mt. Sinai J. Med. N. Y.* 73, 657–672.
- Cederbaum, A.I., Qureshi, A., 1982. Role of catalase and hydroxyl radicals in the oxidation of methanol by rat liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 31, 329–335.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012. Chemical agents and related occupations. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 100, 9–562.

- Chen, C.-H., Budas, G.R., Churchill, E.N., Disatnik, M.-H., Hurley, T.D., Mochly-Rosen, D., 2008. Activation of Aldehyde Dehydrogenase-2 Reduces Ischemic Damage to the Heart. *Science* 321, 1493–1495. doi:10.1126/science.1158554
- Chen, X., Meng, Z., Wang, X., Zeng, S., Huang, W., 2011. The nuclear receptor CAR modulates alcohol-induced liver injury. *Lab. Invest.* 91, 1136–1145. doi:10.1038/labinvest.2011.68
- Chng, H.T., New, L.S., Neo, A.H., Goh, C.W., Browne, E.R., Chan, E.C.Y., 2009. Distribution study of orally administered lipoic acid in rat brain tissues. *Brain Res.* 1251, 80–86. doi:10.1016/j.brainres.2008.11.025
- Chuang, D.T., Hu, C.C., Ku, L.S., Niu, W.L., Myers, D.E., Cox, R.P., 1984. Catalytic and structural properties of the dihydrolipoyl transacylase component of bovine branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 259, 9277–9284.
- Chuwers, P., Osterloh, J., Kelly, T., D'Alessandro, A., Quinlan, P., Becker, C., 1995. Neurobehavioral effects of low-level methanol vapor exposure in healthy human volunteers. *Environ. Res.* 71, 141–150.
- Cohen, G., Sinet, P.M., Heikkila, R., 1980. Ethanol oxidation by rat brain in vivo. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 4, 366–370.
- Colonna-Cesari, F., Perahia, D., Karplus, M., Eklund, H., Brädén, C.I., Tapia, O., 1986. Interdomain motion in liver alcohol dehydrogenase. Structural and energetic analysis of the hinge bending mode. *J. Biol. Chem.* 261, 15273–15280.
- Cook, M.R., Bergman, F.J., Cohen, H.D., Gerkovich, M.M., Graham, C., Harris, R.K., Siemann, L.G., 1991. Effects of methanol vapor on human neurobehavioral measures. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 1–45.
- Coon, M.J., Koop, D.R., 1987. Alcohol-inducible cytochrome P-450 (P-450ALC). *Arch. Toxicol.* 60, 16–21. doi:10.1007/BF00296940
- Correa, M., Salamone, J.D., Segovia, K.N., Pardo, M., Longoni, R., Spina, L., Peana, A.T., Vinci, S., Acquas, E., 2012. Piecing together the puzzle of acetaldehyde as a neuroactive agent. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36, 404–430. doi:10.1016/j.neubiorev.2011.07.009

- Cossins, E.A., 1964. The utilization of carbon-1 compounds by plants: i. The metabolism of methanol-c14 and its role in amino acid biosynthesis. *Can. J. Biochem.* 42, 1793–1802. doi:10.1139/o64-190
- Costi, M., Ferrari, S., Venturelli, A., Calo, S., Tondi, D., Barlocco, D., 2005. Thymidylate Synthase Structure, Function and Implication in Drug Discovery. *Curr. Med. Chem.* 12, 2241–2258. doi:10.2174/0929867054864868
- Cuthbert, G.L., Daujat, S., Snowden, A.W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P.D., Tempst, P., Bannister, A.J., others, 2004. Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* 118, 545–553.
- Danielsson, O., Jörnvall, H., 1992. “Enzymogenesis”: classical liver alcohol dehydrogenase origin from the glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 9247–9251.
- Davies, M., 2003. The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. *J. Psychiatry Neurosci.* JPN 28, 263–274.
- Deng, C., Sun, Z., Tong, G., Yi, W., Ma, L., Zhao, B., Cheng, L., Zhang, J., Cao, F., Yi, D., 2013. α -Lipoic acid reduces infarct size and preserves cardiac function in rat myocardial ischemia/reperfusion injury through activation of PI3K/Akt/Nrf2 pathway. *PloS One* 8, e58371. doi:10.1371/journal.pone.0058371
- Dixit, S., Dhar, P., Mehra, R.D., 2011. Protective role of exogenous α -lipoic acid (ALA) on hippocampal antioxidant status and memory function in rat pups exposed to sodium arsenite during the early post-natal period. *Toxicol. Mech. Methods* 21, 216–224. doi:10.3109/15376516.2010.538751
- Donnelly, M.I., Dagley, S., 1980. Production of methanol from aromatic acids by *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 142, 916–924.
- Dorokhov, Y.L., Komarova, T.V., Petrunia, I.V., Kosorukov, V.S., Zinovkin, R.A., Shindyapina, A.V., Frolova, O.Y., Gleba, Y.Y., 2012. Methanol May Function as a Cross-Kingdom Signal. *PLoS ONE* 7, e36122. doi:10.1371/journal.pone.0036122

- Dorokhov, Y.L., Shindyapina, A.V., Sheshukova, E.V., Komarova, T.V., 2015. Metabolic Methanol: Molecular Pathways and Physiological Roles. *Physiol. Rev.* 95, 603–644. doi:10.1152/physrev.00034.2014
- Dressman, J.B., Berardi, R.R., Dermentzoglou, L.C., Russell, T.L., Schmaltz, S.P., Barnett, J.L., Jarvenpaa, K.M., 1990. Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women. *Pharm. Res.* 7, 756–761.
- Dunkel, P., Gelain, A., Barlocco, D., Haider, N., Gyires, K., Sperlágh, B., Magyar, K., Maccioni, E., Fadda, A., Mátyus, P., 2008. Semicarbazide-sensitive amine oxidase/vascular adhesion protein 1: recent developments concerning substrates and inhibitors of a promising therapeutic target. *Curr. Med. Chem.* 15, 1827–1839.
- Eklund, H., Samama, J.P., Wallén, L., 1982. Pyrazole binding in crystalline binary and ternary complexes with liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry (Mosc.)* 21, 4858–4866.
- Enderby, B., Lenney, W., Brady, M., Emmett, C., Spaněl, P., Smith, D., 2009. Concentrations of some metabolites in the breath of healthy children aged 7-18 years measured using selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS). *J. Breath Res.* 3, 36001. doi:10.1088/1752-7155/3/3/036001
- Enoch, M.-A., Rosser, A.A., Zhou, Z., Mash, D.C., Yuan, Q., Goldman, D., 2014. Expression of glutamatergic genes in healthy humans across 16 brain regions; altered expression in the hippocampus after chronic exposure to alcohol or cocaine. *Genes Brain Behav.* 13, 758–768. doi:10.1111/gbb.12179
- Evelson, P., Travacio, M., Repetto, M., Escobar, J., Llesuy, S., Lissi, E.A., 2001. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch. Biochem. Biophys.* 388, 261–266. doi:10.1006/abbi.2001.2292
- Fall, R., Benson, A.A., n.d. Leaf methanol — the simplest natural product from plants. *Trends Plant Sci.* 1, 296–301. doi:10.1016/S1360-1385(96)88175-0
- Fava, A., Pirritano, D., Plastino, M., Cristiano, D., Puccio, G., Colica, C., Ermio, C., De Bartolo, M., Mauro, G., Bosco, D., 2013. The Effect of Lipoic Acid Therapy on Cognitive Functioning in Patients with Alzheimer's Disease. *J. Neurodegener. Dis.* 2013, 454253. doi:10.1155/2013/454253

- Feierman, D.E., Cederbaum, A.I., 1985. Interaction of pyrazole and 4-methylpyrazole with hepatic microsomes: effect on cytochrome P-450 content, microsomal oxidation of alcohols, and binding spectra. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 9, 421–428.
- Fong, W.P., Keung, W.M., 1987. Substrate specificity of human class I alcohol dehydrogenase homo- and heterodimers containing the beta 2 (Oriental) subunit. *Biochemistry (Mosc.)* 26, 5726–5732.
- Fornieris, F., Binda, C., Dall’Aglia, A., Fraaije, M.W., Battaglioli, E., Mattevi, A., 2006. A Highly Specific Mechanism of Histone H3-K4 Recognition by Histone Demethylase LSD1. *J. Biol. Chem.* 281, 35289–35295. doi:10.1074/jbc.M607411200
- Fox, J.T., Stover, P.J., 2008. Folate-mediated one-carbon metabolism. *Vitam. Horm.* 79, 1–44. doi:10.1016/S0083-6729(08)00401-9
- Fridericia, L.S., Freudenthal, P., Gudjonsson, S., Johansen, G., Schoubye, N., 1927. Refection, a Transmissible Change in the Intestinal Content, enabling Rats to grow and thrive without Vitamin B in the Food. *J. Hyg. (Lond.)* 27, 70–102.
- Gagnon, C., Harbour, D., Camato, R., 1984. Purification and characterization of protein methyltransferase from rat kidney. *J. Biol. Chem.* 259, 10212–10215.
- Galter, D., Carmine, A., Buervenich, S., Duester, G., Olson, L., 2003. Distribution of class I, III and IV alcohol dehydrogenase mRNAs in the adult rat, mouse and human brain. *Eur. J. Biochem.* 270, 1316–1326. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03502.x
- Gerken, T., Girard, C.A., Tung, Y.-C.L., Webby, C.J., Saudek, V., Hewitson, K.S., Yeo, G.S.H., McDonough, M.A., Cunliffe, S., McNeill, L.A., Galvanovskis, J., Rorsman, P., Robins, P., Prieur, X., Coll, A.P., Ma, M., Jovanovic, Z., Farooqi, I.S., Sedgwick, B., Barroso, I., Lindahl, T., Ponting, C.P., Ashcroft, F.M., O’Rahilly, S., Schofield, C.J., 2007. The Obesity-Associated FTO Gene Encodes a 2-Oxoglutarate-Dependent Nucleic Acid Demethylase. *Science* 318, 1469–1472. doi:10.1126/science.1151710
- Gloeckler, R., Ohsawa, I., Speck, D., Ledoux, C., Bernard, S., Zinsius, M., Villeval, D., Kisou, T., Kamogawa, K., Lemoine, Y., 1990. Cloning and characterization of the *Bacillus sphaericus* genes controlling the bioconversion of pimelate into dethiobiotin. *Gene* 87, 63–70.

- Gonzalez, F.J., 2006. CYP2E1. *Drug Metab. Dispos.* 35, 1–8. doi:10.1124/dmd.106.012492
- Gubisne-Haberle, D., Hill, W., Kazachkov, M., Richardson, J.S., Yu, P.H., 2004. Protein cross-linkage induced by formaldehyde derived from semicarbazide-sensitive amine oxidase-mediated deamination of methylamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310, 1125–1132. doi:10.1124/jpet.104.068601
- Harris, R.A., Joshi, M., Jeoung, N.H., Obayashi, M., 2005. Overview of the molecular and biochemical basis of branched-chain amino acid catabolism. *J. Nutr.* 135, 1527S–30S.
- Harrison, E.H., McCormick, D.B., 1974. The metabolism of dl-[1, 6-¹⁴C] lipoic acid in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* 160, 514–522.
- He, L., Liu, B., Dai, Z., Zhang, H.-F., Zhang, Y.-S., Luo, X.-J., Ma, Q.-L., Peng, J., 2012. Alpha lipoic acid protects heart against myocardial ischemia-reperfusion injury through a mechanism involving aldehyde dehydrogenase 2 activation. *Eur. J. Pharmacol.* 678, 32–38. doi:10.1016/j.ejphar.2011.12.042
- He, X., Li, Z., Rizak, J.D., Wu, S., Wang, Z., He, R., Su, M., Qin, D., Wang, J., Hu, X., 2016. Resveratrol Attenuates Formaldehyde Induced Hyperphosphorylation of Tau Protein and Cytotoxicity in N2a Cells. *Front. Neurosci.* 10, 598. doi:10.3389/fnins.2016.00598
- Huttlin, E.L., Jedrychowski, M.P., Elias, J.E., Goswami, T., Rad, R., Beausoleil, S.A., Villén, J., Haas, W., Sowa, M.E., Gygi, S.P., 2010. A Tissue-Specific Atlas of Mouse Protein Phosphorylation and Expression. *Cell* 143, 1174–1189. doi:10.1016/j.cell.2010.12.001
- Ifuku, O., Miyaoka, H., Koga, N., Kishimoto, J., Haze, S., Wachi, Y., Kajiwara, M., 1994. Origin of carbon atoms of biotin. ¹³C-NMR studies on biotin biosynthesis in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 220, 585–591.
- Ishikawa, H., Ishikawa, T., Yamamoto, H., Fukao, A., Yokoyama, K., 2007. Genotoxic effects of alcohol in human peripheral lymphocytes modulated by ADH1B and ALDH2 gene polymorphisms. *Mutat. Res.* 615, 134–142. doi:10.1016/j.mrfmmm.2006.11.026
- Jalkanen, S., Salmi, M., 2001. Cell surface monoamine oxidases: enzymes in search of a function. *EMBO J.* 20, 3893–3901. doi:10.1093/emboj/20.15.3893

- Jayani, R.S., Saxena, S., Gupta, R., 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochem.* 40, 2931–2944. doi:10.1016/j.procbio.2005.03.026
- Jin, M., Ande, A., Kumar, A., Kumar, S., 2013. Regulation of cytochrome P450 2e1 expression by ethanol: role of oxidative stress-mediated *pkc/jnk/sp1* pathway. *Cell Death Dis.* 4, e554. doi:10.1038/cddis.2013.78
- Kagan, V.E., Shvedova, A., Serbinova, E., Khan, S., Swanson, C., Powell, R., Packer, L., 1992. Dihydrolipoic acid--a universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. Reduction of peroxy, ascorbyl and chromanoxyl radicals. *Biochem. Pharmacol.* 44, 1637–1649.
- Kalhan, S.C., 2013. One-carbon metabolism, fetal growth and long-term consequences. *Nestle Nutr. Inst. Workshop Ser.* 74, 127–138. doi:10.1159/000348459
- Kamarudin, M.N.A., Mohd Raflee, N.A., Hussein, S.S.S., Lo, J.Y., Supriady, H., Abdul Kadir, H., 2014. (R)-(+)- α -lipoic acid protected NG108-15 cells against H₂O₂-induced cell death through PI3K-Akt/GSK-3 β pathway and suppression of NF- κ β -cytokines. *Drug Des. Devel. Ther.* 8, 1765–1780. doi:10.2147/DDDT.S67980
- Kato, N., Yamagami, T., Shima, M., Sakazawa, C., 1986. Formaldehyde dismutase, a novel NAD-binding oxidoreductase from *Pseudomonas putida* F61. *Eur. J. Biochem.* 156, 59–64.
- Keilin, D., Hartree, E.F., 1945. Properties of catalysis of coupled oxidation of alcohols. *Biochem. J.* 39, 293–301.
- Kersten, P.J., Dagley, S., Whittaker, J.W., Arciero, D.M., Lipscomb, J.D., 1982. 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid, a catabolite of gallic acids in *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.* 152, 1154–1162.
- Kervern, M., Silvestre de Ferron, B., Alaux-Cantin, S., Fedorenko, O., Antol, J., Naassila, M., Pierrefiche, O., 2015. Aberrant NMDA-dependent LTD after perinatal ethanol exposure in young adult rat hippocampus. *Hippocampus* 25, 912–923. doi:10.1002/hipo.22414
- Keung, W.M., Vallee, B.L., 1993. Daidzin: a potent, selective inhibitor of human mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 1247–1251. doi:10.1073/pnas.90.4.1247
- Kikuchi, G., 1973. The glycine cleavage system: composition, reaction mechanism, and physiological significance. *Mol. Cell. Biochem.* 1, 169–187.

- Kim, D.-K., Kim, Y.-H., Jang, H.-H., Park, J., Kim, J.R., Koh, M., Jeong, W.-I., Koo, S.-H., Park, T.-S., Yun, C.-H., Park, S.B., Chiang, J.Y.L., Lee, C.-H., Choi, H.-S., 2013. Estrogen-related receptor γ controls hepatic CB₁ receptor-mediated CYP2E1 expression and oxidative liver injury by alcohol. *Gut* 62, 1044–1054. doi:10.1136/gutjnl-2012-303347
- Knockaert, L., Fromenty, B., Robin, M.-A., 2011. Mechanisms of mitochondrial targeting of cytochrome P450 2E1: physiopathological role in liver injury and obesity. *FEBS J.* 278, 4252–4260. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08357.x
- Koike, M., Reed, L.J., Carroll, W.R., 1960. alpha-Keto acid dehydrogenation complexes. I. Purification and properties of pyruvate and alpha-ketoglutarate dehydrogenation complexes of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 235, 1924–1930.
- Komarova, T.V., Petrunia, I.V., Shindyapina, A.V., Silachev, D.N., Sheshukova, E.V., Kiryanov, G.I., Dorokhov, Y.L., 2014. Endogenous Methanol Regulates Mammalian Gene Activity. *PLoS ONE* 9, e90239. doi:10.1371/journal.pone.0090239
- Konrad, D., Somwar, R., Sweeney, G., Yaworsky, K., Hayashi, M., Ramlal, T., Klip, A., 2001. The antihyperglycemic drug alpha-lipoic acid stimulates glucose uptake via both GLUT4 translocation and GLUT4 activation: potential role of p38 mitogen-activated protein kinase in GLUT4 activation. *Diabetes* 50, 1464–1471.
- Konstandi, M., Johnson, E.O., Lang, M.A., 2014. Consequences of psychophysiological stress on cytochrome P450-catalyzed drug metabolism. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 45, 149–167. doi:10.1016/j.neubiorev.2014.05.011
- Kostic, M.A., Dart, R.C., 2003. Rethinking the toxic methanol level. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 41, 793–800.
- Krau, S.D., 2013. Cytochrome p450 part 3: drug interactions: essential concepts and considerations. *Nurs. Clin. North Am.* 48, 697–706. doi:10.1016/j.cnur.2013.09.004
- Krebs, H.A., Perkins, J.R., 1970. The physiological role of liver alcohol dehydrogenase. *Biochem. J.* 118, 635–644.

- Ku, R.H., Billings, R.E., 1984. Relationships between formaldehyde metabolism and toxicity and glutathione concentrations in isolated rat hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 51, 25–36.
- Lachance, P., Mac-Way, F., Desmeules, S., De Serres, S.A., Julien, A.-S., Douville, P., Ghannoum, M., Agharazii, M., 2015. Prediction and validation of hemodialysis duration in acute methanol poisoning. *Kidney Int.* 88, 1170–1177. doi:10.1038/ki.2015.232
- Laethem, R.M., Balazy, M., Falck, J.R., Laethem, C.L., Koop, D.R., 1993. Formation of 19(S)-, 19(R)-, and 18(R)-hydroxyeicosatetraenoic acids by alcohol-inducible cytochrome P450 2E1. *J. Biol. Chem.* 268, 12912–12918.
- Lai, Y., Yu, R., Hartwell, H.J., Moeller, B.C., Bodnar, W.M., Swenberg, J.A., 2016. Measurement of Endogenous versus Exogenous Formaldehyde-Induced DNA-Protein Crosslinks in Animal Tissues by Stable Isotope Labeling and Ultrasensitive Mass Spectrometry. *Cancer Res.* 76, 2652–2661. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2527
- Lee, S.-L., Shih, H.-T., Chi, Y.-C., Li, Y.-P., Yin, S.-J., 2011. Oxidation of methanol, ethylene glycol, and isopropanol with human alcohol dehydrogenases and the inhibition by ethanol and 4-methylpyrazole. *Chem. Biol. Interact.* 191, 26–31. doi:10.1016/j.cbi.2010.12.005
- Li, J.-H., Ju, G.-X., Jiang, J., Li, N.-S., Peng, J., Luo, X.-J., 2016. Lipoic acid protects gastric mucosa from ethanol-induced injury in rat through a mechanism involving aldehyde dehydrogenase 2 activation. *Alcohol* 56, 21–28. doi:10.1016/j.alcohol.2016.10.004
- Li, R.-J., Ji, W.-Q., Pang, J.-J., Wang, J.-L., Chen, Y.-G., Zhang, Y., 2013. Alpha-lipoic acid ameliorates oxidative stress by increasing aldehyde dehydrogenase-2 activity in patients with acute coronary syndrome. *Tohoku J. Exp. Med.* 229, 45–51.
- Li, T.K., Theorell, H., 1969. Human liver alcohol dehydrogenase: inhibition by pyrazole and pyrazole analogs. *Acta Chem. Scand.* 23, 892–902.
- Lieber, C.S., 2004. The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role. *Drug Metab. Rev.* 36, 511–529. doi:10.1081/DMR-200033441
- Lieber, C.S., 1999. Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968-1998)--a review. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 23, 991–1007.

- Lieber, C.S., DeCarli, L.M., 1968. Ethanol oxidation by hepatic microsomes: adaptive increase after ethanol feeding. *Science* 162, 917–918.
- Lin, S., Hanson, R.E., Cronan, J.E., 2010. Biotin synthesis begins by hijacking the fatty acid synthetic pathway. *Nat. Chem. Biol.* 6, 682–688. doi:10.1038/nchembio.420
- Lindinger, W., Taucher, J., Jordan, A., Hansel, A., Vogel, W., 1997. Endogenous production of methanol after the consumption of fruit. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 21, 939–943.
- Lipscomb, M.L., Palomares, L.A., Hernández, V., Ramírez, O.T., Kompala, D.S., 2005. Effect of production method and gene amplification on the glycosylation pattern of a secreted reporter protein in CHO cells. *Biotechnol. Prog.* 21, 40–49. doi:10.1021/bp049761m
- Lipsky, J.J., Shen, M.L., Naylor, S., 2001. In vivo inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram. *Chem. Biol. Interact.* 130–132, 93–102.
- Liu, X., Wang, Y., Han, K., 2007. Systematic study on the mechanism of aldehyde oxidation to carboxylic acid by cytochrome P450. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 12, 1073–1081. doi:10.1007/s00775-007-0277-z
- Low, J.K.K., Hart-Smith, G., Erce, M.A., Wilkins, M.R., 2014. The *Saccharomyces cerevisiae* poly(A)-binding protein is subject to multiple post-translational modifications, including the methylation of glutamic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443, 543–548. doi:10.1016/j.bbrc.2013.12.009
- Lowe, E.D., Gao, G.-Y., Johnson, L.N., Keung, W.M., 2008. Structure of daidzin, a naturally occurring anti-alcohol-addiction agent, in complex with human mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *J. Med. Chem.* 51, 4482–4487. doi:10.1021/jm800488j
- Lu, J., Miao, J., Su, T., Liu, Y., He, R., 2013. Formaldehyde induces hyperphosphorylation and polymerization of Tau protein both in vitro and in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 4102–4116. doi:10.1016/j.bbagen.2013.04.028
- Lu, K., Boysen, G., Gao, L., Collins, L.B., Swenberg, J.A., 2008. Formaldehyde-induced histone modifications in vitro. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 1586–1593. doi:10.1021/tx8000576
- Lu, Y., Cederbaum, A.I., 2008. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 723–738. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.11.004

- Lu, Y., Zhang, X.H., Cederbaum, A.I., 2012. Ethanol Induction of CYP2A5: Role of CYP2E1-ROS-Nrf2 Pathway. *Toxicol. Sci.* 128, 427–438. doi:10.1093/toxsci/kfs164
- Lv, C., Wu, C., Zhou, Y.-H., Shao, Y., Wang, G., Wang, Q.-Y., 2014. Alpha Lipoic Acid Modulated High Glucose-Induced Rat Mesangial Cell Dysfunction via mTOR/p70S6K/4E-BP1 Pathway. *Int. J. Endocrinol.* 2014, 658589. doi:10.1155/2014/658589
- MacDonald, R.C., Fall, R., 1993. Detection of substantial emissions of methanol from plants to the atmosphere. *Atmospheric Environ. Part Gen. Top.* 27, 1709–1713. doi:10.1016/0960-1686(93)90233-O
- McConnell, E.L., Basit, A.W., Murdan, S., 2008. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *J. Pharm. Pharmacol.* 60, 63–70. doi:10.1211/jpp.60.1.0008
- McMartin, K.E., Sebastian, C.S., Dies, D., Jacobsen, D., 2012. Kinetics and metabolism of fomepizole in healthy humans. *Clin. Toxicol.* 50, 375–383. doi:10.3109/15563650.2012.683197
- Mehrotra, A., Sandhir, R., 2014. Mitochondrial cofactors in experimental Huntington's disease: behavioral, biochemical and histological evaluation. *Behav. Brain Res.* 261, 345–355. doi:10.1016/j.bbr.2013.12.035
- Metz, B., Kersten, G.F.A., Baart, G.J.E., de Jong, A., Meiring, H., ten Hove, J., van Steenbergen, M.J., Hennink, W.E., Crommelin, D.J.A., Jiskoot, W., 2006. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with insulin. *Bioconjug. Chem.* 17, 815–822. doi:10.1021/bc050340f
- Micheli, F., n.d. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends Plant Sci.* 6, 414–419. doi:10.1016/S1360-1385(01)02045-3
- Moini, H., Tirosh, O., Park, Y.C., Cho, K.-J., Packer, L., 2002. R-alpha-lipoic acid action on cell redox status, the insulin receptor, and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 384–391. doi:10.1006/abbi.2001.2680

- Molotkov, A., Fan, X., Deltour, L., Foglio, M.H., Martras, S., Farrés, J., Parés, X., Duester, G., 2002. Stimulation of retinoic acid production and growth by ubiquitously expressed alcohol dehydrogenase Adh3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 5337–5342. doi:10.1073/pnas.082093299
- Moullis, J.M., Holmquist, B., Vallee, B.L., 1991. Hydrophobic anion activation of human liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry (Mosc.)* 30, 5743–5749.
- Muggirani, G., Fois, G.R., Diana, M., 2013. Ethanol-derived acetaldehyde: pleasure and pain of alcohol mechanism of action. *Front. Behav. Neurosci.* 7, 87. doi:10.3389/fnbeh.2013.00087
- Mukerjee, N., Pietruszko, R., 1992. Human mitochondrial aldehyde dehydrogenase substrate specificity: comparison of esterase with dehydrogenase reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 299, 23–29.
- Munoz-Clares, R.A., Gonzalez-Segura, L., Murillo-Melo, D.S., Riveros-Rosas, H., 2017. Mechanisms of protection against irreversible oxidation of the catalytic cysteine of ALDH enzymes: Possible role of vicinal cysteines. *Chem. Biol. Interact.* doi:10.1016/j.cbi.2017.02.007
- Nakano, K., Matuda, S., Yamanaka, T., Tsubouchi, H., Nakagawa, S., Titani, K., Ohta, S., Miyata, T., 1991. Purification and molecular cloning of succinyltransferase of the rat alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex. Absence of a sequence motif of the putative E3 and/or E1 binding site. *J. Biol. Chem.* 266, 19013–19017.
- Nemecek-Marshall, M., MacDonald, R.C., Franzen, J.J., Wojciechowski, C.L., Fall, R., 1995. Methanol Emission from Leaves (Enzymatic Detection of Gas-Phase Methanol and Relation of Methanol Fluxes to Stomatal Conductance and Leaf Development). *Plant Physiol.* 108, 1359–1368.
- Nie, C.L., Wei, Y., Chen, X., Liu, Y.Y., Dui, W., Liu, Y., Davies, M.C., Tendler, S.J.B., He, R.G., 2007. Formaldehyde at Low Concentration Induces Protein Tau into Globular Amyloid-Like Aggregates In Vitro and In Vivo. *PLOS ONE* 2, e629. doi:10.1371/journal.pone.0000629
- Norberg, A., Gabrielsson, J., Jones, A.W., Hahn, R.G., 2002. Within- and between-subject variations in pharmacokinetic parameters of ethanol by analysis of breath, venous blood and urine: Pharmacokinetics of intravenous ethanol. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 49, 399–408. doi:10.1046/j.1365-2125.2000.00194.x

- Ortega-Atienza, S., Rubis, B., McCarthy, C., Zhitkovich, A., 2016. Formaldehyde Is a Potent Proteotoxic Stressor Causing Rapid Heat Shock Transcription Factor 1 Activation and Lys48-Linked Polyubiquitination of Proteins. *Am. J. Pathol.* 186, 2857–2868. doi:10.1016/j.ajpath.2016.06.022
- Packer, L., 1998. alpha-Lipoic acid: a metabolic antioxidant which regulates NF-kappa B signal transduction and protects against oxidative injury. *Drug Metab. Rev.* 30, 245–275. doi:10.3109/03602539808996311
- Packer, L., Kraemer, K., Rimbach, G., 2001. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 17, 888–895.
- Pares, S., Cohen-Addad, C., Sieker, L., Neuburger, M., Douce, R., 1994. X-ray structure determination at 2.6-Å resolution of a lipoate-containing protein: the H-protein of the glycine decarboxylase complex from pea leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 4850–4853.
- Parés, X., Vallee, B.L., 1981. New human liver alcohol dehydrogenase forms with unique kinetic characteristics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98, 122–130.
- Pascual, M., Pla, A., Minarro, J., Guerri, C., 2014. Neuroimmune Activation and Myelin Changes in Adolescent Rats Exposed to High-Dose Alcohol and Associated Cognitive Dysfunction: A Review with Reference to Human Adolescent Drinking. *Alcohol Alcohol* 49, 187–192. doi:10.1093/alcalc/agt164
- Patel, R.N., Hou, C.T., Felix, A., 1978. Microbial oxidation of methane and methanol: isolation of methane-utilizing bacteria and characterization of a facultative methane-utilizing isolate. *J. Bacteriol.* 136, 352–358.
- Perez-Miller, S., Younus, H., Vanam, R., Chen, C.-H., Mochly-Rosen, D., Hurley, T.D., 2010. Alda-1 is an agonist and chemical chaperone for the common human aldehyde dehydrogenase 2 variant. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 159–164. doi:10.1038/nsmb.1737
- Perkins, R.A., Ward, K.W., Pollack, G.M., 1995. A pharmacokinetic model of inhaled methanol in humans and comparison to methanol disposition in mice and rats. *Environ. Health Perspect.* 103, 726–733.

- Pontel, L.B., Rosado, I.V., Burgos-Barragan, G., Garaycochea, J.I., Yu, R., Arends, M.J., Chandrasekaran, G., Broecker, V., Wei, W., Liu, L., Swenberg, J.A., Crossan, G.P., Patel, K.J., 2015. Endogenous Formaldehyde Is a Hematopoietic Stem Cell Genotoxin and Metabolic Carcinogen. *Mol. Cell* 60, 177–188. doi:10.1016/j.molcel.2015.08.020
- Pontén, F., Gry, M., Fagerberg, L., Lundberg, E., Asplund, A., Berglund, L., Oksvold, P., Björling, E., Hober, S., Kampf, C., Navani, S., Nilsson, P., Ottosson, J., Persson, A., Wernérus, H., Wester, K., Uhlén, M., 2009. A global view of protein expression in human cells, tissues, and organs. *Mol. Syst. Biol.* 5, 337. doi:10.1038/msb.2009.93
- Porter, S.L., Wadhams, G.H., Armitage, J.P., 2011. Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 153–165. doi:10.1038/nrmicro2505
- Pronko, P.S., Velichko, M.G., Moroz, A.R., Rubanovich, N.N., 1997. Low-molecular-weight metabolites relevant to ethanol metabolism: correlation with alcohol withdrawal severity and utility for identification of alcoholics. *Alcohol Alcohol. Oxf. Oxf.* 32, 761–768.
- Putnam, C.D., Arvai, A.S., Bourne, Y., Tainer, J.A., 2000. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J. Mol. Biol.* 296, 295–309. doi:10.1006/jmbi.1999.3458
- Rietjens, S.J., de Lange, D.W., Meulenbelt, J., 2014. Ethylene glycol or methanol intoxication: which antidote should be used, fomepizole or ethanol? *Neth. J. Med.* 72, 73–79.
- Rodionov, D.A., Mironov, A.A., Gelfand, M.S., 2002. Conservation of the biotin regulon and the BirA regulatory signal in Eubacteria and Archaea. *Genome Res.* 12, 1507–1516. doi:10.1101/gr.314502
- Roe, O., 1955. The metabolism and toxicity of methanol. *Pharmacol. Rev.* 7, 399–412.
- Ronis, M.J., Huang, J., Crouch, J., Mercado, C., Irby, D., Valentine, C.R., Lumpkin, C.K., Ingelman-Sundberg, M., Badger, T.M., 1993. Cytochrome P450 CYP 2E1 induction during chronic alcohol exposure occurs by a two-step mechanism associated with blood alcohol concentrations in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264, 944–950.

- Rosado, I.V., Langevin, F., Crossan, G.P., Takata, M., Patel, K.J., 2011. Formaldehyde catabolism is essential in cells deficient for the Fanconi anemia DNA-repair pathway. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 1432–1434. doi:10.1038/nsmb.2173
- Sahr, T., Ravanel, S., Rébeillé, F., 2005. Tetrahydrofolate biosynthesis and distribution in higher plants. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 758–762. doi:10.1042/BST0330758
- Salem, A.R., Large, P.J., Quayle, J.R., 1972. Glycine formation during growth of *Pseudomonas* AM1 on methanol and succinate. *Biochem. J.* 128, 1203–1211.
- Sanishvili, R., Yakunin, A.F., Laskowski, R.A., Skarina, T., Evdokimova, E., Doherty-Kirby, A., Lajoie, G.A., Thornton, J.M., Arrowsmith, C.H., Savchenko, A., Joachimiak, A., Edwards, A.M., 2003. Integrating structure, bioinformatics, and enzymology to discover function: BioH, a new carboxylesterase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 278, 26039–26045. doi:10.1074/jbc.M303867200
- Sarkola, T., Eriksson, C.J., 2001. Effect of 4-methylpyrazole on endogenous plasma ethanol and methanol levels in humans. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 25, 513–516.
- Shen, M.L., Johnson, K.L., Mays, D.C., Lipsky, J.J., Naylor, S., 2001. Determination of in vivo adducts of disulfiram with mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* 61, 537–545.
- Shi, C., Zhou, X., Zhang, J., Wang, J., Xie, H., Wu, Z., 2016. α -Lipoic acid protects against the cytotoxicity and oxidative stress induced by cadmium in HepG2 cells through regeneration of glutathione by glutathione reductase via Nrf2/ARE signaling pathway. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 45, 274–281. doi:10.1016/j.etap.2016.06.003
- Shindyapina, A.V., Petrunia, I.V., Komarova, T.V., Sheshukova, E.V., Kosorukov, V.S., Kiryanov, G.I., Dorokhov, Y.L., 2014. Dietary Methanol Regulates Human Gene Activity. *PLoS ONE* 9, e102837. doi:10.1371/journal.pone.0102837
- Shinto, L., Quinn, J., Montine, T., Dodge, H.H., Woodward, W., Baldauf-Wagner, S., Waichunas, D., Bumgarner, L., Bourdette, D., Silbert, L., Kaye, J., 2014. A randomized placebo-controlled pilot trial of omega-3 fatty acids and alpha lipoic acid in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 38, 111–120. doi:10.3233/JAD-130722

- Shore, J.D., Gilleland, M.J., 1970. Binding and kinetic studies of liver alcohol dehydrogenase-coenzyme-pyrazole complexes. *J. Biol. Chem.* 245, 3422–3425.
- Siragusa, R.J., Cerda, J.J., Baig, M.M., Burgin, C.W., Robbins, F.L., 1988. Methanol production from the degradation of pectin by human colonic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 47, 848–851.
- Smith, A.R., Shenvi, S.V., Widlansky, M., Suh, J.H., Hagen, T.M., 2004. Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 11, 1135–1146.
- Smith, M., Hopkinson, D.A., Harris, H., 1973a. Studies on the properties of the human alcohol dehydrogenase isozymes determined by the different loci ADH1, ADH2, ADH3. *Ann. Hum. Genet.* 37, 49–67.
- Smith, M., Hopkinson, D.A., Harris, H., 1973b. Studies on the subunit structure and molecular size of the human alcohol dehydrogenase isozymes determined by the different loci, ADH1, ADH2, and ADH3. *Ann. Hum. Genet.* 36, 401–414.
- Song, M.-S., Baker, G.B., Dursun, S.M., Todd, K.G., 2010. The antidepressant phenelzine protects neurons and astrocytes against formaldehyde-induced toxicity. *J. Neurochem.* 114, 1405–1413. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06857.x
- Songur, A., Sarsilmaz, M., Ozen, O., Sahin, S., Koken, R., Zararsiz, I., Ilhan, N., 2008. The effects of inhaled formaldehyde on oxidant and antioxidant systems of rat cerebellum during the postnatal development process. *Toxicol. Mech. Methods* 18, 569–574. doi:10.1080/15376510701555288
- Sonopo, M.S., Venter, K., Winks, S., Marjanovic-Painter, B., Morgans, G.L., Zeevaart, J.R., 2016. Carbon-14 radiolabelling and tissue distribution evaluation of a potential anti-TB compound: Carbon-14 radiolabelling and tissue distribution of pyrazole derivative. *J. Label. Compd. Radiopharm.* 59, 264–269. doi:10.1002/jlcr.3391
- Sophos, N.A., Vasiliou, V., 2003. Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. *Chem. Biol. Interact.* 143–144, 5–22.
- Speit, G., Kuhner, S., Linsenmeyer, R., Schutz, P., 2011. Does formaldehyde induce aneuploidy? *Mutagenesis* 26, 805–811. doi:10.1093/mutage/ger050

- Sprung, R., Chen, Y., Zhang, K., Cheng, D., Zhang, T., Peng, J., Zhao, Y., 2008. Identification and Validation of Eukaryotic Aspartate and Glutamate Methylation in Proteins. *J. Proteome Res.* 7, 1001–1006. doi:10.1021/pr0705338
- Stanković, M.N., Mladenović, D., Ninković, M., Đuričić, I., Šobajić, S., Jorgačević, B., de Luka, S., Vukicevic, R.J., Radosavljević, T.S., 2014. The Effects of α -Lipoic Acid on Liver Oxidative Stress and Free Fatty Acid Composition in Methionine–Choline Deficient Diet-Induced NAFLD. *J. Med. Food* 17, 254–261. doi:10.1089/jmf.2013.0111
- Steinhoff, U., 2005. Who controls the crowd? New findings and old questions about the intestinal microflora. *Immunol. Lett.* 99, 12–16. doi:10.1016/j.imlet.2004.12.013
- Stover, P.J., 2009. One-Carbon Metabolism-Genome Interactions in Folate-Associated Pathologies. *J. Nutr.* 139, 2402–2405. doi:10.3945/jn.109.113670
- Sundstrom-Poromaa, I., Smith, D.H., Gong, Q.H., Sabado, T.N., Li, X., Light, A., Wiedmann, M., Williams, K., Smith, S.S., 2002. Hormonally regulated $\alpha 4\beta 2\delta$ GABAA receptors are a target for alcohol. *Nat. Neurosci.* doi:10.1038/nn888
- Sweeting, J.N., Siu, M., McCallum, G.P., Miller, L., Wells, P.G., 2010. Species differences in methanol and formic acid pharmacokinetics in mice, rabbits and primates. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 247, 28–35. doi:10.1016/j.taap.2010.05.009
- Tephly, T.R., 1991. The toxicity of methanol. *Life Sci.* 48, 1031–1041.
- Thompson, C.M., Ceder, R., Grafström, R.C., 2010. Formaldehyde dehydrogenase: beyond phase I metabolism. *Toxicol. Lett.* 193, 1–3. doi:10.1016/j.toxlet.2009.11.023
- Thurman, R.G., Ley, H.G., Scholz, R., 1972. Hepatic microsomal ethanol oxidation. Hydrogen peroxide formation and the role of catalase. *Eur. J. Biochem.* 25, 420–430.
- Tibullo, D., Li Volti, G., Giallongo, C., Grasso, S., Tomassoni, D., Anfuso, C.D., Lupo, G., Amenta, F., Avola, R., Bramanti, V., 2017. Biochemical and clinical relevance of alpha lipoic acid: antioxidant and anti-inflammatory activity, molecular pathways and therapeutic potential. *Inflamm. Res.* doi:10.1007/s00011-017-1079-6

- Toews, M.L., Adler, J., 1979. Methanol formation in vivo from methylated chemotaxis proteins in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 254, 1761–1764.
- Tong, Z., Han, C., Luo, W., Wang, X., Li, H., Luo, H., Zhou, J., Qi, J., He, R., 2013. Accumulated hippocampal formaldehyde induces age-dependent memory decline. *AGE* 35, 583–596. doi:10.1007/s11357-012-9388-8
- Tong, Z., Han, C., Qiang, M., Wang, W., Lv, J., Zhang, S., Luo, W., Li, H., Luo, H., Zhou, J., Wu, B., Su, T., Yang, X., Wang, X., Liu, Y., He, R., 2015. Age-related formaldehyde interferes with DNA methyltransferase function, causing memory loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 36, 100–110. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.07.018
- Tong, Z., Zhang, J., Luo, W., Wang, W., Li, F., Li, H., Luo, H., Lu, J., Zhou, J., Wan, Y., He, R., 2011. Urine formaldehyde level is inversely correlated to mini mental state examination scores in senile dementia. *Neurobiol. Aging* 32, 31–41. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.07.013
- Tran, M.-N., Wu, A.H.B., Hill, D.W., 2007. Alcohol dehydrogenase and catalase content in perinatal infant and adult livers: Potential influence on neonatal alcohol metabolism. *Toxicol. Lett.* 169, 245–252. doi:10.1016/j.toxlet.2007.01.012
- Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P., Zhang, Y., 2005. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 439, 811–816. doi:10.1038/nature04433
- Turner, C., Spanel, P., Smith, D., 2006. A longitudinal study of methanol in the exhaled breath of 30 healthy volunteers using selected ion flow tube mass spectrometry, SIFT-MS. *Physiol. Meas.* 27, 637–648. doi:10.1088/0967-3334/27/7/007
- Tye, R., Willetts, A., 1977. Fungal growth on C1 compounds: quantitative aspects of growth of a methanol-utilizing strain of *Trichoderma lignorum* in batch culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 758–761.
- Unzeta, M., Solé, M., Boada, M., Hernández, M., 2007. Semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) and its possible contribution to vascular damage in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 114, 857–862. doi:10.1007/s00702-007-0701-0

- Vestal, R.E., McGuire, E.A., Tobin, J.D., Andres, R., Norris, A.H., Mezey, E., 1977. Aging and ethanol metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther.* 21, 343–354.
- Vetrano, A.M., Heck, D.E., Mariano, T.M., Mishin, V., Laskin, D.L., Laskin, J.D., 2005. Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase. *J. Biol. Chem.* 280, 35372–35381. doi:10.1074/jbc.M503991200
- Vetreno, R.P., Crews, F.T., 2012. Adolescent binge drinking increases expression of the danger signal receptor agonist HMGB1 and Toll-like receptors in the adult prefrontal cortex. *Neuroscience* 226, 475–488. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.08.046
- Wagner, F.W., Burger, A.R., Vallee, B.L., 1983. Kinetic properties of human liver alcohol dehydrogenase: oxidation of alcohols by class I isoenzymes. *Biochemistry (Mosc.)* 22, 1857–1863.
- Wagner, F.W., Parés, X., Holmquist, B., Vallee, B.L., 1984. Physical and enzymatic properties of a class III isozyme of human liver alcohol dehydrogenase: chi-ADH. *Biochemistry (Mosc.)* 23, 2193–2199.
- Wang, J., Du, H., Jiang, L., Ma, X., de Graaf, R.A., Behar, K.L., Mason, G.F., 2013. Oxidation of ethanol in the rat brain and effects associated with chronic ethanol exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 14444–14449. doi:10.1073/pnas.1306011110
- Wenzel, P., Hink, U., Oelze, M., Schuppan, S., Schaeuble, K., Schildknecht, S., Ho, K.K., Weiner, H., Bachschmid, M., Munzel, T., Daiber, A., 2007. Role of reduced lipoic acid in the redox regulation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (aldh-2) activity: implications for mitochondrial oxidative stress and nitrate tolerance. *J. Biol. Chem.* 282, 792–799. doi:10.1074/jbc.M606477200
- Wu, D., Cederbaum, A.I., 2003. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res. Health J. Natl. Inst. Alcohol Abuse Alcohol.* 27, 277–284.
- Xiao, Z., Xu, P., 2007. Acetoin metabolism in bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 33, 127–140. doi:10.1080/10408410701364604
- Yu, P.H., Wright, S., Fan, E.H., Lun, Z.-R., Gubisne-Harberle, D., 2003. Physiological and pathological implications of semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1647, 193–199.

- Zakhari, S., 2006. Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Res. Health J. Natl. Inst. Alcohol Abuse Alcohol.* 29, 245–254.
- Zakharov, S., Kurcova, I., Navratil, T., Salek, T., Komarc, M., Pelclova, D., 2015. Is the Measurement of Serum Formate Concentration Useful in the Diagnostics of Acute Methanol Poisoning? A Prospective Study of 38 Patients. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 116, 445–451. doi:10.1111/bcpt.12338
- Zanger, U.M., Schwab, M., 2013. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther.* 138, 103–141. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.12.007
- Zararsiz, I., Kus, I., Akpolat, N., Songur, A., Ogeturk, M., Sarsilmaz, M., 2006. Protective effects of omega-3 essential fatty acids against formaldehyde-induced neuronal damage in prefrontal cortex of rats. *Cell Biochem. Funct.* 24, 237–244. doi:10.1002/cbf.1204
- Zhong, Y., Dong, G., Luo, H., Cao, J., Wang, C., Wu, J., Feng, Y.-Q., Yue, J., 2012. Induction of brain CYP2E1 by chronic ethanol treatment and related oxidative stress in hippocampus, cerebellum, and brainstem. *Toxicology* 302, 275–284. doi:10.1016/j.tox.2012.08.009
- Zhu, H., Itoh, K., Yamamoto, M., Zweier, J.L., Li, Y., 2005. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. *FEBS Lett.* 579, 3029–3036. doi:10.1016/j.febslet.2005.04.058
- Zimatkin, S.M., Buben, A.L., 2007. Ethanol oxidation in the living brain. *Alcohol Alcohol. Oxf. Oxf.* 42, 529–532. doi:10.1093/alcalc/agn059
- Zimatkin, S.M., Pronko, S.P., Vasiliou, V., Gonzalez, F.J., Deitrich, R.A., 2006. Enzymatic Mechanisms of Ethanol Oxidation in the Brain. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 30, 1500–1505. doi:10.1111/j.1530-0277.2006.00181.x