



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.151: 612.352.3: 543.544

doi: 10.17308/sorpchrom.2022.22/10893

Применение ионообменной хроматографии для очистки глутатионредуктазы из печени крыс с парацетамол-индуцированным поражением печени для исследования некоторых каталитических свойств

Светлана Евгеньевна Кравцова¹✉,

Татьяна Николаевна Попова¹, Евгений Дмитриевич Крыльский¹,

Лариса Владимировна Матасова¹, Юлия Игоревна Лебедева¹

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, vip.sveta.popova@mail.ru✉

Аннотация. Целью работы явилось исследование активности глутатионредуктазы (ГР, КФ 1.8.1.7.) при парацетамол-индуцированном поражении печени (ППП), а также выделение и очистка фермента с использованием гель-фильтрации и ионообменной хроматографии для оценки некоторых каталитических и регуляторных свойств. ППП моделировали путем однократного перорального введения ацетаминофена самцам белых лабораторных крыс (*Rattus norvegicus*) Wistar в дозе 1000 мг/кг массы тела, растворенного в 1 см³ вазелинового масла. Животные контрольной группы получали вазелиновое масло. Активность ГР определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм. Очистку фермента из печени крыс осуществляли с помощью фракционирования сульфатом аммония, гель-фильтрации через сефадекс G-25, а также ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. Общее количество белка в пробах определяли при помощи набора BSA protein assay kit. В ходе работы была получена ГР из печени крыс с ППП со степенью очистки 33.3. С использованием метода двойных обратных координат Лайнуивера-Берка показано, что введение крысам парацетамола сопровождалось увеличением сродства фермента к НАДФН. Добавление в реакционную среду изоцитрата и глюкозо-6-фосфата, являющихся субстратами ферментов-поставщиков НАДФН для восстановления окисленного глутатиона, способствовало более выраженной активации ГР из печени животных с ППП по сравнению с контрольной группой. Наблюдаемое возрастание активности ГР при добавлении изоцитрата и глюкозо-6-фосфата было, по-видимому, связано с дополнительным активирующим действием данных соединений на фермент, реализующимся в условиях окисления восстановленного глутатиона при ППП. В то же время, введение в среду спектрофотометрирования цитрата приводило к более существенному снижению активности ГР относительно контрольных показателей. Наблюдаемые изменения свойств фермента могли быть связаны с наличием у цитрата антиоксидантных свойств, снижающих интенсивность свободнорадикального окисления при ППП. Таким образом, путём фракционирования, гель-фильтрации и ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе был получен очищенный препарат ГР из печени крыс с ППП, для которого продемонстрировано увеличение сродства к НАДФН и изменение регуляции активности под действием цитрата, изоцитрата и глюкозо-6-фосфата.

Ключевые слова: глутатионредуктаза, парацетамол-индуцированное поражение печени, окислительный стресс, ионообменная хроматография.

Благодарности: работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-00526 А).

Для цитирования: Кравцова С.Е., Попова Т.Н., Крыльский Е.Д., Матасова Л.В. Лебедева Ю.И. Применение ионообменной хроматографии для очистки глутатионредуктазы из печени крыс с парацетамол-индуцированным поражением печени для исследования некоторых каталитических свойств // *Сорбционные и хроматографические процессы. 2022. Т. 22, № 6. С. 869-876.* <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10893>



Original article

Using ion-exchange chromatography to purify glutathione reductase from the liver of rats with paracetamol-induced liver disease to investigate some catalytic properties

Svetlana E. Kravtsova^{1✉}, Tatyana N. Popova¹, Evgenii D. Kryl'skii¹,
Larisa V. Matasova¹, Yuliya I. Lebedeva¹

¹Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, vip.sveta.popova@mail.ru[✉]

Abstract. The purpose of the work was to study the activity of glutathione reductase (GR, EC 1.8.1.7.) in case of paracetamol-induced liver disease (PLD) and to isolate and purify the enzyme using gel filtration and ion-exchange chromatography to evaluate some catalytic and regulatory properties. PLD was simulated by a single oral administration of acetaminophen to white male laboratory Wistar rats (*Rattus norvegicus*). The dosage was 1000 mg/kg of rat's weight in 1 cm³ of paraffinic oil. Animals of the control group were given paraffinic oil. The activity of GR was determined spectrophotometrically at a wavelength of 340 nm. The purification of the enzyme from the liver of rats was carried out using fractionation with ammonium sulphate, gel filtration through Sephadex G-25, and ion exchange chromatography through DEAE-cellulose. The total amount of protein in the samples was determined using the BCA protein assay kit. As a result, GR was obtained from the liver of rats with PLD with a purification degree of 33.3. Using the Lineweaver–Burk method of double inverse coordinates, it was shown that the administration of paracetamol to rats was accompanied by an increase in the affinity of the enzyme for NADPH. The addition to the reaction medium of isocitrate and glucose-6-phosphate, which are substrates of enzymes supplying NADPH for the reduction of oxidised glutathione, contributed to a more pronounced activation of GR from the liver of animals with PLD as compared to the control group. The observed increase in GR activity with the addition of isocitrate and glucose-6-phosphate was apparently associated with an additional activating effect of these compounds on the enzyme, which occurred under the conditions of oxidation of reduced glutathione in the case of PLD. At the same time, the introduction of citrate into the spectrophotometry media led to a more significant decrease in GR activity relative to the control values. The observed changes in the enzyme properties could be associated with antioxidant properties of the citrate, which reduced the intensity of free radical oxidation in the case of PLD. Therefore, fractionation, gel filtration, and ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose were used to obtain a purified GR preparation from the liver of rats with PLD which demonstrated an increase in affinity for NADPH and a change in the activity regulation under the action of citrate, isocitrate, and glucose-6-phosphate.

Keywords: glutathione reductase, paracetamol-induced liver disease, oxidative stress, ion exchange chromatography.

Acknowledgments: the reported study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project No.20-04-00526 A).

For citation: Kravtsova S.E., Popova T.N., Kryl'skii E.D., Matasova L.V., Lebedeva Yu.I. Using ion-exchange chromatography to purify glutathione reductase from the liver of rats with paracetamol-induced liver disease to investigate some catalytic properties. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2022. 22(6): 869-876. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10893>

Введение

В настоящее время количество людей с патологиями печени неуклонно растёт, основной причиной этого выступает увеличение метаболической нагрузки на данный орган, в том числе, вследствие избыточного поступления лекарственных препаратов [1]. Токсическое действие ксенобиотиков и их метаболитов приводит к поражению печени, которое сопро-

вождается воспалительной реакцией, цитолизом и развитием фиброза и цирроза [2]. Множество исследований подтверждают, что в патогенезе заболеваний печени ведущую роль играет окислительный стресс [3]. Как известно, метаболизм широкого ряда лекарственных препаратов сопровождается избыточным образованием реактивных молекул, что характерно, в том числе, для парацетамола



(ацетаминофена), широко используемого для моделирования лекарственных повреждений печени [4]. Обезвреживание высоких концентраций данного ксенобиотика в печени осуществляется с непосредственным участием восстановленного глутатиона (GSH) – ключевого компонента неферментативного звена антиоксидантной системы. При этом, в случае избыточного поступления в организм парацетамола развивается истощение запасов GSH, что приводит к накоплению свободных радикалов, способных повреждать необходимые для жизнедеятельности биомолекулы гепатоцитов [5]. Превращение окисленного глутатиона в восстановленную форму обеспечивается благодаря функционированию ГР за счет окисления НАДФН [6]. ГР является флавиновым ферментом и относится к семейству нуклеотиддисульфидных оксидоредуктаз. По субъединичному строению ГР представляет из себя гомодимер, причём субстрат-связывающие сайты и общая первичная структура различных изоформ фермента чрезвычайно консервативны. ГР играет центральную роль в регуляции клеточного редокс-гомеостаза за счёт поддержания необходимого уровня GSH у представителей различных таксономических групп [7]. Таким образом, представляет интерес исследование регуляторных и каталитических свойств ГР печени в условиях нарушения оксидативного статуса, вызванного введением парацетамола. Для анализа физико-химических аспектов функционирования ферментов требуется их получение в очищенном состоянии. Для этой цели в современной биохимии наиболее широко применяются различные виды колоночной хроматографии.

Исходя из этого, целью настоящей работы явилась очистка ГР с использованием ионообменной и гель-хроматографии, исследование её сродства к НАДФН, а также анализ регуляторного воздействия цитрата, изоцитрата и глю-

козо-6-фосфата на данный фермент из печени крыс с парацетамол-индуцированным поражением печени (ППП).

Экспериментальная часть

Объектом исследования выступали самцы белых лабораторных крыс Wistar массой 200-250 г (Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, Россия, Московская обл.). Все манипуляции были выполнены в соответствии с правилами гуманного обращения с лабораторными животными (Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010) и санитарными нормами вивариев (ГОСТ 33216-2014). В ходе эксперимента крысы были разделены на 2 группы: 1 группа (n=8) состояла из контрольных животных, которые содержались на стандартном режиме вивария и получали перорально вазелиновое масло; 2 группа (n=8) включала крыс с ППП, которое моделировали путем перорального введения ацетаминофена, растворенного в 1 см³ вазелинового масла, в дозе 1000 мг/кг массы тела животного [8]. Печень наркотизированных животных забирали через 24 часа после введения парацетамола. Ткань печени гомогенизировали в 4-х кратном объеме среды выделения, содержащей 0.05 М трис-HCl буфер (pH=7.8), 1мМ ЭДТА, 1% β-меркаптоэтанол, после чего гомогенат центрифугировали при 8000 g в течение 15 мин. Полученный супернатант использовали для дальнейших исследований.

Активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ) в сыворотке крови крыс оценивали с помощью диагностических наборов фирмы Ольвекс (Россия). Скорость ГР реакции оценивали спектрофотометрически при длине волны 340 нм [9]. В основе метода лежало падение оптической плотности в результате окисления НАДФН. За единицу активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее превращение 1 мкмоль субстрата

за 1 минуту при 25°C. Активность фермента выражали в виде удельной активности. Среда спектрофотометрирования для ГР которая имела следующий состав: 50 mM калий-фосфатный буфер (pH 7.4), содержащий 1mM ЭДТА, 0.16 mM НАДФН, 0.85 mM GSH. Концентрацию белка определяли с помощью коммерческого набора BSA protein assay kit (BioVision, США).

Использовалась следующая схема очистки для получения ферментных препаратов ГР. Разделение белков проводили сульфатом аммония ((NH₄)₂SO₄). Для этого использовали ступенчатое повышение концентрации фракционирующего агента в гомогенате от 0 до 40%, затем от 40 до 70%. С помощью гель-фильтрации через сефадекс G-25 (1.7×20 см) проводили дальнейшую очистку. Образец наносили в количестве не более 20-25% от объёма колонки. Калий-фосфатный буфер (pH 7.4) 0.01 M использовали в качестве элюирующей среды. Скорость элюции составляла 25-30 см³/ч. Ферментативную активность оценивали в каждой фракции объёмом 2 см³. Фракции, характеризующиеся максимальной активностью, объединяли и использовали для дальнейшей очистки с использованием ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (1.2×13см). После сорбции белка использовали градиент концентрации KCl в среде элюции для десорбции ГР. Скорость элюции составляла 20-25 см³/час. Ферментативную активность и содержание белка анализировали в каждой фракции, объёмом 2 см³. Фракции с максимальной активностью фермента объединяли. Все этапы выделе-

ния и очистки фермента осуществляли при температуре 0-4°C. Константу Михаэлиса (K_m) определяли методом двойных обратных координат Лайнуивера-Берка.

Опыты проводили в 8-кратных биологических и 2-кратных аналитических повторностях. Результаты обрабатывали с применением методов описательной статистики путём определения выборочного среднего, выборочного стандартного отклонения, стандартной ошибки среднего. Нормальность распределения значений в группах анализировалось с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Результаты работы оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Достоверными считали различия при p<0.05.

Обсуждение результатов

Проведённые исследования показали, что внутрижелудочное введение животным парацетамола в дозе 1000 мг/кг приводило к возрастанию активности АлАТ и АсАТ в сыворотке крови, что подтверждало развитие ППП (таблица 1). На первом этапе очистки ГР из печени животных с ППП, осуществляемом путём фракционирования с помощью ступенчатого повышения концентрации (NH₄)₂SO₄, удалось получить ферментный препарат, очищенный в 2.5 раза (таблица 2). На следующем этапе очистку ГР проводили с использованием гель-фильтрации на сефадексе G-25 с целью удаления низкомолекулярных примесей. Дальнейшую очистку фермента осуществляли на ДЭАЭ-целлюлозе, в результате чего удалось получить ферментный препарат со

Таблица 1 Маркерные показатели цитолиза гепатоцитов в сыворотке крови крыс контрольной группы (Контроль) и животных с парацетамол-индуцированным повреждением печени (Парацетамол).

Table 1 Marker indices of hepatocyte cytolysis in the blood serum of rats of the control group (Control) and animals with paracetamol-induced liver disease (Paracetamol).

Показатель	Контроль	Парацетамол
Активность аланинаминотрансферазы, Е/дм ³	0.257±0.012	0.524±0.026
Активность аспартатаминотрансферазы, Е/дм ³	0.245±0.011	0.443±0.022

Таблица 2. Очистка глутатионредуктазы из печени крыс контрольной групп (Контроль) и животных с парацетамол-индуцированным повреждением печени (Парацетамол).
 Table 2. Purification of glutathione reductase from the liver of control rats (Control) and animals with paracetamol-induced liver disease (Paracetamol).

Стадия очистки	Условия	Общая активность, Е	Количество белка, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	Контроль	2.67±0.11	243.1±9.66	0.011±0.001	100	1
	Парацетамол	6.98±0.35	415.3±20.81	0.017±0.001	100	1
Фракционирование (NH ₄) ₂ SO ₄	Контроль	2.44±0.09	198.2±9.85	0.013±0.001	91	1.2
	Парацетамол	2.56±0.13	45.1±2.26	0.043±0.002	37	2.5
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	Контроль	2.29±0.08	115.0±5.77	0.020±0.001	86	1.8
	Парацетамол	1.52±0.08	37.8±1.91	0.047±0.003	22	2.7
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	Контроль	1.21±0.04	1.9±0.08	0.600±0.027	45	54.5
	Парацетамол	1.05±0.03	9.7±0.52	0.575±0.030	15	33.3

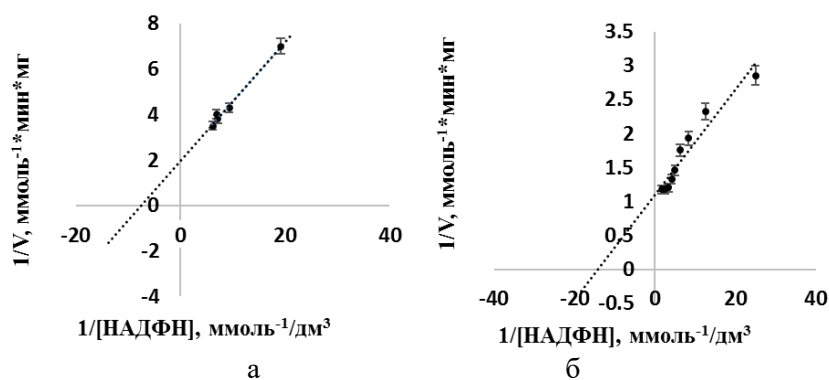


Рис. 1. Представленная в двойных обратных координатах Лайнуивера-Берка зависимость скорости реакции, катализируемой глутатионредуктазой, от концентрации НАДФН, у животных контрольной группы (а) и крыс с парацетамол-индуцированным поражением печени (б).

Fig. 1. Dependence (shown using the Lineweaver–Burk method of double inverse coordinates) of the rate of reaction catalysed by glutathione reductase on the NADPH concentration in animals of the control group (a) and rats with paracetamol-induced liver disease (b).

степенью очистки 33.3. Частично очищенный ферментный препарат использовали для выяснения каталитических и регуляторных свойств.

Результаты работы показали, что у крыс с ППП Км по отношению к НАДФН, рассчитанная методом двойных обратных координат Лайнуивера-Берка, снижалась относительно значений контрольных животных (рис. 1). Наблюдаемое возрастание сродства ГР к НАДФН, по-видимому, было сопряжено с увеличением активности фермента, происходящим в результате окисления GSH в ходе метаболизма парацетамола. Так, из-

вестно, что парацетамол окисляется в печени цитохромом P450, в результате образуется высокореактивный токсичный электрофильный алкилирующий метаболит N-ацетил-п-бензохинонимин, который инактивируется с помощью конъюгации с GSH [10].

Как известно, в условиях парацетамоловой интоксикации происходит снижение запасов GSH и связанное с этим накопление реактивных молекул, повреждающих жизненно важные клеточные структуры [11]. В связи с этим, было проведено исследование регуляторного воздействия цитрата, изоцитрата и глюкозо-6-фосфата на активность ГР из печени

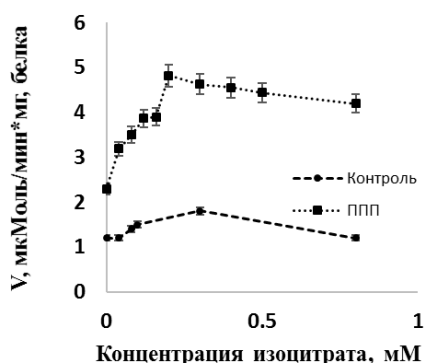


Рис. 2. Влияние изоцитрата на активность глутатионредуктазы из печени крыс контрольной группы (Контроль) и животных с парацетамол-индуцированным поражением печени (ППП).

Fig.2. The effect of isocitrate on the activity of glutathione reductase from the liver of control rats (Control) and animals with paracetamol-induced liver disease (Paracetamol).

крыс с ППП. Изоцитрат и глюкозо-6-фосфат являются субстратами для НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы – основных поставщиков НАДФН для функционирования ГР. В результате проведенных исследований было показано, что изоцитрат способствует более существенной активации ГР из печени крыс с ППП в концентрациях до 0.2 мМ, по сравнению с контрольными показателями. При дальнейшем увеличении концентрации данного соединения, наблюдалось снижение ферментативной активности (рис. 2). Было также показано, что у животных с ППП наблюдалось более значительное возрастание активности ГР при добавлении в реакционную среду глюкозо-6-фосфата (рис. 3). Наблюдаемые изменения регуляторных свойств ГР у крыс с патологией, очевидно, были связаны с дополнительным активирующим действием изоцитрата и глюкозо-6-фосфата на фермент, что могло происходить в условиях окисления GSH в процессе метаболизма парацетамола.

Интерес также представляет анализ воздействия цитрата на активность ГР

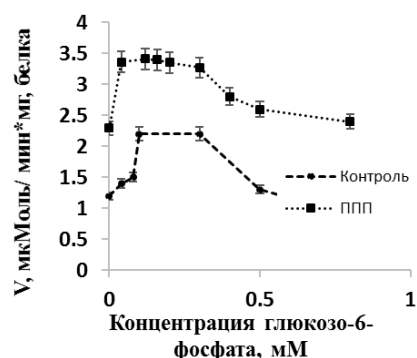


Рис. 3. Влияние глюкозо-6-фосфата на активность глутатионредуктазы крыс контрольной группы (Контроль) и животных с парацетамол-индуцированным поражением печени (ППП).

Fig. 3. The effect of glucose-6-phosphate on the activity of glutathione reductase from the liver of control rats (Control) and animals with paracetamol-induced liver disease (Paracetamol).

при ППП. Как показали проведенные исследования, добавление в реакционную среду цитрата существенно снижало активность ГР из печени животных с ППП в концентрации до 0,2 мМ, по сравнению с ГР из печени контрольных крыс (рис. 4). Наблюдаемые изменения свойств фермента могут быть обусловлены наличием у цитрата антиоксидантных свойств, способствующих снижению окислительной нагрузки, вызванной введением парацетамола. Так, известно, что цитрат способен хелатировать ионы Fe^{2+} и Ca^{2+} . Свободные ионы Fe^{2+} являются прооксидантами благодаря способности инициировать в реакции Фентона генерацию гидроксильного радикала, который обладает чрезвычайно высокой реакционной способностью [12]. Ионы Ca^{2+} выступают активаторами НАДФН-оксидазы, способной образовывать супероксидный анион-радикал, дающий начало другим более реакционноспособным реактивным молекулам [13]. Ионы Ca^{2+} также увеличивают активность фосфолипаз, расщепляющих компоненты биологических мембран клеток.

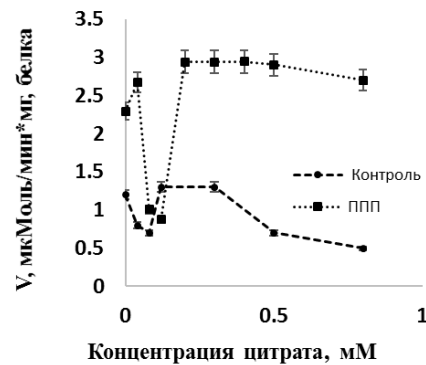


Рис.4. Влияние цитрата на активность глутатионредуктазы из печени крыс контрольной группы (Контроль) и животных с парацетамол-индуцированным поражением печени (ППП).
 Fig. 4. The effect of citrate on the activity of glutathione reductase from the liver of control rats (Control) and animals with paracetamol-induced liver disease (Paracetamol).

Таким образом, путём фракционирования с помощью $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, гель-фильтрации и ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе был получен частично очищенный препарат ГР из печени животных с ППП. Ключевой стадией очистки при этом, позволившей избавиться от значительного количества примесей, была ионообменная хроматография, в результате которой удалось получить достаточно чистый препарат ГР для оценки регуляторных свойств фермента. На основании проведенных исследований было показано, что в условиях ППП происходит увеличение сродства ГР к НАДФН и изменение её регуляции под действием цитрата, изоцитрата и глюкозо-6-фосфата, что, по-видимому, связано с активацией фермента на фоне истощения запасов GSH.

Заключение

В ходе исследований с использованием гель-фильтрации на сефадексе G-25 и ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе была получена ГР из

Список литературы/References

1. Korenskaya E.G., Paramonova O.V. Medicinal liver damage is one of the important problems in a comorbid patient. *Consilium Medicum*. 2019; 21(8): 78-83. <https://doi.org/10.26442/20751753.2019.8.190355>
2. Kong L.Z., Chandimali N, Han Y.H., Lee D.H., Kim J.S., Kim S.U., Kim T.D., Jeong

печени крыс с ППП со степенью очистки 33.3. Показано, что на фоне развития патологии происходила активация фермента и увеличение сродства ГР к НАДФН. Кроме этого, у ГР из печени крыс с ППП наблюдалось более существенное увеличение активности при добавлении в реакционную среду изоцитрата и глюкозо-6-фосфата – субстратов для ферментов-поставщиков НАДФН. Для ГР из печени крыс с ППП наблюдалось также более значительное снижение активности при добавлении цитрата, что могло быть связано с конформационными перестройками фермента вследствие наличия у данного метаболита антиоксидантных свойств.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

- D.K., Sun H.N., Lee D.S., Kwon T. Pathogenesis, Early Diagnosis, and Therapeutic Management of Alcoholic Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(11): 2712-2733. <https://doi.org/10.3390/ijms20112712>
3. Cichoż-Lach H., Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(25): 8082-8091. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i25.8082>



4. Newsome P.N., Plevris J.N., Nelson L.J., Hayes P.C. Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation *Liver Transpl.* 2000; 6: 21-31. <https://doi.org/10.1002/lt.500060110>
5. Polson J., Lee W.M., American Association for the Study of Liver Disease. AASLD position paper: the management of acute liver failure. *Hepatology.* 2015; 41(5): 1179-1197. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i25.8082>
6. Wang Z., Hao W., Hu J. Maltol improves APAP-induced hepatotoxicity by inhibiting oxidative stress and inflammation response via NF- κ B and PI3K/Akt signal pathways. *Antioxidants.* 2019; 8(9): 395-398. <https://doi.org/10.3390/antiox8090395>
7. Hasanuzzaman M., Bhuyan, M.H.M.B., Anee, T.I., Parvin, K., Nahar, K., Mahmud, J.A., Fujita, M. Regulation of Ascorbate-Glutathione Pathway in Mitigating Oxidative Damage in Plants under Abiotic Stress. *Antioxidants.* 2019; 8: 384. <https://doi.org/10.3390/antiox8090384>
8. Mitchel J.R., Jallow D.G., Potter W.Z., Acetaminophen-induced hepatic necrosis. Protective role of glutathione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003; 187: 211-217. <https://doi.org/10.3390/antiox8090395>
9. Popov S.S., Agarkov A.A., Kryl'skiy E.D., Shul'gin K.K., Popova T.N., Safonova O.A. The activity of glutathione reductase under liver pathologies and enzyme purification by ion-exchange chromatography for the catalytic properties study. *Sorbtsionnye I Khromatograficheskie Protsessy.* 2018; 7(1): 168-175.
10. Jönsson B.A.G., Ermund A., Andersson D.A., Björk H, Alexander J.P. Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *J Biol Chem.* 2015; 280: 31405-31412. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501489200>
11. Graham G.G., Davies M.J., Day R.O., Mohamudally A., Scott K.F. The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology.* 2013; 21: 201-232. <https://doi.org/10.1007/s10787-013-0172-x>
12. Tran R.T., Yang J., Ameer G.A. Citrate-Based Biomaterials and Their Applications in Regenerative Engineering. *Annu Rev Mater Res.* 2015; 45: 277-310. <https://doi.org/10.1146/annurev-matsci-070214-020815>
13. Akram M. Citric Acid Cycle and Role of its Intermediates in Metabolism. *Cell Biochem Biophys.* 2014; 68: 475-478. <https://doi.org/10.1007/s12013-013-9750-1>

Информация об авторах / Information about the authors

С.Е. Кравцова – аспирант кафедры медицинской биохимии и микробиологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Т.Н. Попова – декан медико-биологического факультета, д.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Е.Д. Крыльский – доцент кафедры медицинской биохимии и микробиологии, к.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Л.В. Матасова – доцент кафедры медицинской биохимии и микробиологии, к.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Ю.И. Лебедева – студент кафедры медицинской биохимии и микробиологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

S.E. Kravtsova – post-graduate student, department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: vip.sveta.popova@mail.ru

T.N. Popova – Dean of the Faculty of Medicine and Biology, grand Ph.D (biology), department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: biomed-popova@yandex.ru

E.D. Kryl'skii – docent, department of medical biochemistry and microbiology, Ph.D (biology), Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: evgenij.krylsky@yandex.ru

L.V. Matasova – docent, department of medical biochemistry and microbiology, Ph.D (biology), Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: larissamatasova@yandex.ru

Yu.I. Lebedeva – student, department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: dorokhova.io@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 20.09.2022; одобрена после рецензирования 16.12.2022; принята к публикации 21.12.2022.

The article was submitted 20.09.2022; approved after reviewing 16.12.2022; accepted for publication 21.12.2022.