



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.152.4

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11322

Использование препарата малатдегидрогеназы, полученного хроматографическим способом, для специфического проявления фумаратгидратазы из гепатоцитов крыс

Наталья Владимировна Селиванова, Максим Юрьевич Бакарев,
Дарья Сергеевна Быстрова, Александр Трофимович Епринцев[✉]

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, bc366@bio.vsu.ru[✉]

Аннотация. Целью данной работы явилось получение хроматографическими методами высокоочищенного препарата малатдегидрогеназы (МДГ) для последующего специфического окрашивания фумаратгидратазы (фумараза, ФГ) из печени здоровых крыс и животных с аллоксановым диабетом. Первым этапом исследования было проведение многоступенчатой схемы очистки МДГ с использованием ионообменной хроматографии в качестве заключительного этапа, в результате которой было получено два ферментных препарата, из которых был выбран образец, проявлявший наибольшую активность (с выходом 20% и удельной активностью 32.5 Е/мг белка). Активность МДГ измеряли спектрофотометрически при длине волны 340 нм, концентрацию белка определяли методом Лоури. Индукцию экспериментального сахарного диабета 1 типа осуществляли однократной внутривенной инъекцией 5% раствора моногидрата аллоксана в 0.9% растворе цитрата натрия самцам белых инбредных лабораторных крыс (*Rattus norvegicus* L) линии Вистар. Животные содержались в виварии с постоянным доступом к корму и воде. Условия эксперимента соответствовали требованиям международных правил гуманного отношения к животным, отражённых в санитарных правилах по отбору и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Все крысы произвольным образом были разделены на 2 группы (Норма и Диабет), по 5 крыс в каждой.

Фумаратгидратаза относится к классу лиаз и не является окислительным ферментом, следовательно, не может быть специфически проявлена в полиакриламидном геле тетразолиевым методом. Однако данную методику специфического окрашивания можно использовать и для ФГ при добавлении в среду проявления малатдегидрогеназы в качестве вспомогательного фермента. Электрофорез в полиакриламидном геле осуществляли в неденатурирующих условиях в Трис-глициновом буфере. Проведенные электрофоретические исследования с последующим окрашиванием геля тетразолиевым методом показали, что в печени и здоровых крыс, и животных с патологией фумаратгидратаза присутствует в виде двух форм с R_f 0.12 и 0.2, соответственно. Анализ субклеточной локализации ФГ показал, что выявленные формы фермента функционируют в цитоплазме и митохондриях печени крыс обеих групп. Таким образом, использование в качестве основного этапа ионообменной хроматографии позволило получить высокоочищенный препарат малатдегидрогеназы, который в дальнейшем использовался в качестве вспомогательного фермента при специфическом окрашивании фумаратгидратазы из печени крыс с аллоксановым диабетом. Полученные результаты свидетельствуют, что развитие сахарного диабета 1 типа, в отличие от некоторых типов онкологий не связано с блокированием одной из форм ФГ.

Ключевые слова: малатдегидрогеназа, фумаратгидратаза, изофермент, специфическое проявление, ионообменная хроматография.

Благодарности: работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект № FZGU-2023-0009

Для цитирования: Селиванова Н.В., Бакарев М.Ю., Быстрова Д.С., Епринцев А.Т. Использование препарата малатдегидрогеназы, полученного хроматографическим способом, для специфического проявления фумаратгидратазы из гепатоцитов крыс // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2023. Т. 23, № 3. С. 426-434. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11322>



Original article

The use of malate dehydrogenase preparation, obtained by the chromatographic method, for the specific staining of fumarate hydratase from rat hepatocytes

Natalia V. Selivanova, Maxim Yu. Bakarev,
Darya S. Bystrova, Alexander T. Eprintsev[✉]

Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, bc366@bio.vsu.ru[✉]

Abstract. The aim of this study was to obtain a highly purified preparation of malate dehydrogenase (MDH) by chromatographic methods for subsequent specific staining of fumarate hydratase (fumarase, FH) from the liver of healthy rats and animals with alloxan-induced diabetes. The first stage of the study was the performance of a multi-stage purification scheme for MDH using ion-exchange chromatography as the final stage, which resulted in the obtaining of two enzyme preparations, from which a sample with the highest activity (with a yield of 20% and a specific activity of 32.5 U/mg protein) was selected. MDH activity was measured spectrophotometrically at a wavelength of 340 nm, protein concentration was determined by the Lowry method. Experimental type 1 diabetes mellitus was induced by a single intraperitoneal injection of 5% alloxan monohydrate solution in 0.9% sodium citrate solution to male white inbred laboratory Wistar rats (*Rattus norvegicus* L). The animals were kept in a vivarium with constant access to food and water. The conditions of the experiment corresponded to the requirements of international rules for the humane treatment of animals, reflected in the sanitary rules for the selection and maintenance of experimental biological clinics (vivariums). All rats were randomly divided into 2 groups (Control and Diabetes), 5 rats in each group.

Fumarate hydratase is a lyase and it is not an oxidizing enzyme; therefore, it cannot be specifically detected in polyacrylamide gel by the tetrazolium method. However, this specific staining technique can also be used for FH by adding malate dehydrogenase as an auxiliary enzyme to the development medium. Polyacrylamide gel electrophoresis was performed under non-denaturing conditions in Tris-glycine buffer. Conducted electrophoretic studies with subsequent staining of the gel with the tetrazolium method showed that in the liver of both healthy rats and animals with pathology, two isoforms of fumarate hydratase with R_f 0.12 and 0.2 respectively, were present. An analysis of the subcellular localization of FH showed that the identified forms of the enzyme function in the cytoplasm and mitochondria of the liver of rats of both groups. Thus, the use of ion-exchange chromatography as the main step allowed to obtain a highly purified preparation of malate dehydrogenase, which was later used as an auxiliary enzyme in the specific staining of fumarate hydratase from the liver of rats with alloxan-induced diabetes. The obtained results indicate that the development of type 1 diabetes mellitus, unlike some types of oncology, is not associated with blocking of one of FH isoforms.

Keywords: malate dehydrogenase, fumarate hydratase, isoenzyme, specific staining, ion exchange chromatography.

Acknowledgments: this work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation as part of a state order for universities in the field of scientific activity for 2023-2025, project no. FZGU-2023-0009

For citation: Selivanova N.V., Bakarev M.Yu., Bystrova D.S., Eprintsev A.T. The use of malate dehydrogenase preparation, obtained by the chromatographic method, for the specific staining of fumarate hydratase from rat hepatocytes. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2023. 23(3): 426-434. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11322>

Введение

У эукариотических организмов все клетки характеризуются наличием субклеточных компартментов, разграниченных полупроницаемой мембраной. Причем идентичные белки могут функционировать в различных органеллах, данное

явление принято называть двойной локализацией, а идентичные популяции белков – эхоформами (в случае ферментов часто используется термин «изоферменты») [1]. К таким протеинам относится и фумаратгидратаза (фумараза, ФГ, КФ 4.2.1.2), обнаруживаемая в митохондриях и цитоплазме всех эукариот [2]. В

литературе имеются данные о том, что при некоторых видах рака наблюдается инактивация митохондриальной формы фермента [3]. Кроме того, показано, что высокие концентрации фумарата вызывают сукцинирование (необратимую неферментативную модификацию остатков цистеина фумаратом с образованием S-(2-сукцинил)цистеина). Например, хроническое сукцинирование глутатиона связано с постоянным окислительным стрессом и клеточным старением [4]. В печени крыс две эзоформы фумаразы кодируются одним геном, который транскрибируется в одну мРНК, содержащую два кодона инициации трансляции. Два продукта трансляции предположительно различаются наличием или отсутствием митохондриальной адресной последовательности [5]. Хотя роль ФГ в норме и различных патологиях довольно активно исследуется [6, 7], локализация изоферментов фумаразы в гепатоцитах крыс при диабете 1 типа остается неясным. Адаптация организма животных к аллоксановому экспериментальному диабету представляет сложный многоэтапный процесс, главным звеном которого является трансформация клеточного метаболизма. Индукция ферментов глиоксилатного цикла и цикла трикарбоновых кислот в тканях животных обеспечивает изменение основных путей метаболизма, обусловленных ресинтезом гликогена в печени крыс при патологиях, связанных с пищевой депривацией и экспериментальным диабетом [8].

В 1956 году Цоу с соавторами опубликовали результаты синтеза нескольких солей тетразолия и указали на возможность их цитохимической оценки для использования данных веществ как индикаторов определенных типов окислительной ферментативной активности [9]. В результате этих исследований было получено вещество $C_{40}H_{30}N_{10}O_6 \cdot 2Cl$, названное нитросиний тетразолий хлорид (НСТ), используемый для электрофоретических исследований оксидоредуктаз

[10]. Этот метод успешно используется для выявления многих и неокислительных ферментов, в том числе и фумаратгидратазы, каталитическая активность которых может быть определена с использованием дегидрогеназ в качестве вспомогательных ферментов [11]. Ранее было обнаружено увеличение активности и появление дополнительной пероксисомальной изоформы малатдегидрогеназы из печени крыс с диабетом [12]. Однако для ФГ информации по изоферментному составу при развитии диабета 1 типа нами найдено не было. В связи с этим целью данной работы явилось получение с помощью хроматографических методов высокоочищенного препарата малатдегидрогеназы для последующего специфического окрашивания фумаратгидратазы из печени здоровых крыс и животных с аллоксановым диабетом.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования использовали ткань печени крыс *Rattus norvegicus* L линии Вистар. Животные содержались в виварии с постоянным доступом к корму и воде. Условия эксперимента соответствовали требованиям международных правил гуманного отношения к животным, отраженных в санитарных правилах по отбору и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

Индукцию экспериментального сахарного диабета осуществляли однократной инъекцией 5%-ного раствора аллоксана, растворенного в 0.9%-ном растворе цитрата натрия в концентрации 120 мг/кг массы тела животного [13]. 10 крыс были произвольным образом разделены на 2 группы по 5 крыс в каждой, крысам группы «Норма» производилась внутрибрюшинная инъекция физраствора, животным из группы «Диабет» осуществляли внутрибрюшинное введение раствора аллоксана.

Для получения образцов для исследования крыс усыпляли эфиром, после чего



проводили декапитацию. Печень многократно промывали ледяным раствором 0.9%-ного хлорида натрия, после чего ткань гомогенизировали в соотношении 1:10 со средой выделения, которая состояла из 50 мМ Tris-HCl-буфера, pH 7.8; 10 мМ MgCl₂; 4 мМ ЭДТА; 4 мМ ДТТ. Затем, центрифугировали 4000 об/мин 5 мин. Выделение ферментов проводилось на холоде при температуре 4°C

Для измерения активности малатдегидрогеназы использовали среду спектрофотометрирования, состоящую из 50 мМ Tris-HCl-буфера, pH 7.8; 10 мМ MgCl₂; 0.2 мМ NADH; 1 мМ оксалоацетата. Активность фермента определяли по снижению оптической плотности при 340 нм за 5 мин с помощью спектрофотометрического метода на СФ-2000 [12]. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата за минуту при стандартных условиях.

С целью получения ферментативного препарата малатдегидрогеназы в высокоочищенном состоянии нами была разработана 4х-стадийная схема очистки, основным (и конечным) этапом которой была ионообменная хроматография на ДЭАЭ-сефацел. Предварительно ткань печени гомогенизировали, концентрировали с помощью высаливания и очищали от низкомолекулярных примесей на сефадексе G-25. После чего подготовленный образец наносили на колонку с ДЭАЭ-сефацел (размер колонки 1.5х 20 см). Далее колонку промывали 20 см³ элюирующего раствора (0.05 М Tris-HCl буфер, pH 7.5, 0.1 мМ ЭДТА и 1% β-меркаптоэтанол) для удаления белков, не связавшихся с анионообменником [14]. Десорбцию заряженных белков с колонки, в том числе и МДГ, осуществляли посредством создания линейного градиента хлорида калия 50-100 ммоль/дм³ в элюирующем буфере. Скорость элюции составляла 30-40 см³/ч. Собирали фракции объемом по 2 см³ и использовали для

анализа на активность МДГ. Все процедуры проводили при температуре +4°C.

Субклеточную локализацию фумаратгидратазы определяли с помощью изоплотностного центрифугирования на центрифуге Beckman (США) при 100 000 g 90 мин при 0°C в градиенте плотности сахарозы (50 мМ фосфатный буфер, pH 7.4; 2 мМ ЭДТА; 3 мМ ДТТ; сахароза в концентрациях 2.5 М, 2.3 М, 1.8 М, 1.5 М, 1.3 М). При этом использовали среду выделения следующего состава: 50 мМ фосфатный буфер, pH 7.4; 1 мМ ЭДТА; 3 мМ ДТТ; 0.4 М сахароза. Полученные фракции осторожно собирали пипеткой и разбавляли буфером до концентрации сахарозы 0.4-0.5 М, а затем центрифугировали 30 мин при 12 000 g для осаждения органелл. Полученные осадки разрушали осмотическим шоком (в 50 мМ трис-HCl буфере, pH 7.5).

Активность ФГ определяли спектрофотометрически при длине волны 240 нм в среде спектрофотометрирования, состоящей из 50 мМ фосфатного буфера, pH 7.4 и 5 мМ малата натрия.

Оценку перекрестного загрязнения определяли по активности маркерных ферментов митохондрий (сукцинатдегидрогеназы [15]), пероксисом (каталаза [16]) и цитоплазмы (алкогольдегидрогеназы [17]).

Электрофорез в полиакриламидном геле проводили в неденатурирующих условиях в Tris-глициновом буфере [18]. Время миграции составляло 40 минут. Специфическое окрашивание фумаратгидратазы осуществляли с помощью тетразолиевого метода с вспомогательным ферментом – малатдегидрогеназой. Среда проявления состояла из 50 мМ Tris-HCl-буфера, pH 7,4; 20 мМ фумарата натрия; 3 мМ НАД⁺; 1 Е МДГ; 0,01 М нитросинего тетразолия; Феназинметасульфат добавляли в расчете 10 мг на 15 см³ раствора [19].

Таблица 1. Этапы получения высокоочищенных препаратов малатдегидрогеназы из печени здоровых крыс, (n=5; p≤0,05).

Table 1. Stages of obtaining highly purified malate dehydrogenase preparations from the liver of healthy rats, (n=5; p≤0.05).

Этап	Активность, Е	Концентрация белка, мг	Удельная активность, Е / мг белка	Выход, %	Степень очистки	
Гомогенат	65.21±0.03	165.52±0,08	0.39	100	1	
Высаливание (35-80%)	27.44±0.01	26.71±0.04	1.03	42	2.6	
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	25.52±0.07	23.72±0.09	1.08	39	2.8	
Ионообменная хроматография на ДЭАЕ-сефацеле	1	9.13±0.04	0.34±0.06	30.3	14	77.8
	2	13.01±0.05	0.43±0.01	32.5	20	83.3

Денситометрический анализ гелей осуществляли с применением программного обеспечения GelAnalyzer 19.1 (www.gelanalyzer.com).

Опыты проводили в пятикратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Для расчетов достоверности полученных результатов использовали программу Статтех (<https://stattech.ru/>).

Обсуждение результатов

Перед началом эксперимента концентрация глюкозы в крови всех животных находилась в пределах нормы (5.1±0.33 ммоль/дм³). На второй день после инъекции аллоксана в крови крыс группы «Диабет» данный показатель увеличился до 15.4±0.12 ммоль/дм³ и держался в пределах этих значений на протяжении всего времени эксперимента. Подобное увеличение уровня сахара в крови связано с разрушением аллоксаном клеток островков Лангерганса и свидетельствует о развитии экспериментального сахарного диабета. Концентрация глюкозы в крови крыс группы «Норма» колебалась в пределах 4.9-5.5 ммоль/дм³.

Фумаратгидратаза относится к классу лиаз и не является окислительным ферментом, следовательно, не может быть

специфически проявлена в полиакриламидном геле тетразолиевым методом (метод специфического проявления дегидрогеназ). Однако в литературе имеются сведения о том, что данную методику специфического окрашивания можно использовать и для ФГ при добавлении в среду проявления малатдегидрогеназу в качестве вспомогательного фермента [11]. Для чего и была проведена очистка малатдегидрогеназы из печени здоровых крыс. Результаты типичной очистки представлены в таблице 1, из которой видно, что использование в качестве последнего этапа ионообменной хроматографии на ДЭАЕ-сефацеле позволило получить высокоочищенные препараты двух изоферментов МДГ с выходом 14 и 20%, соответственно.

Хроматограмма типичной очистки малатдегидрогеназы представлена на рисунке 1, которая подтверждает, что изоферменты малатдегидрогеназы десорбировались с колонки ДЭАЕ-сефацела при концентрациях хлорида калия 100 и 120 мМ, соответственно.

Для дальнейших исследований использовали препарат МДГ2, так как активность, выход и степень очистки данной изоформы были больше, чем те же

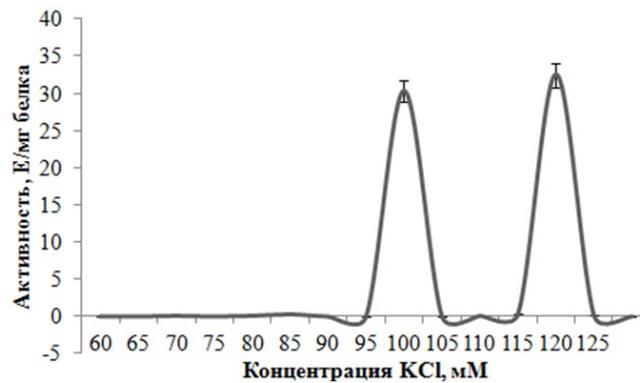


Рис. 1. Типичная хроматограмма ионообменного разделения изоферментов малатдегидрогеназы.

Fig. 1. Typical chromatogram of ion exchange separation of malate dehydrogenase isoenzymes.

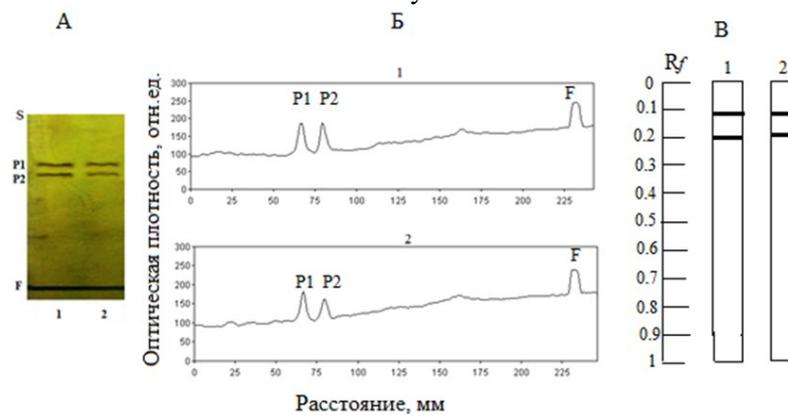


Рис. 2. Специфическое проявление фумаратгидратазы из печени здоровых крыс (2) и животных с аллоксановым диабетом (1). S – линия старта, P1, P2 – белковые полосы; F – лидирующий краситель. А – электрофореграмма. Б – денситограмма. В – рисунок электрофореграммы

Fig. Specific manifestation of fumarate hydratase from the liver of healthy rats (2) and animals with alloxan diabetes (1). S – start line, P1, P2 – protein bands; F – leading dye. A – electrophoregram. B – densitogram, B – drawing of the electrophoregram

показатели у МДГ1. Проведенные электрофоретические исследования с последующим окрашиванием геля тетразолиевым методом показали, что в печени и здоровых крыс, и животных с патологией фумаратгидратаза присутствует в виде двух форм (рис. 2). Результаты денситометрии свидетельствуют об увеличении активности обеих форм фумаратгидратазы в печени крыс с аллоксановым диабетом относительно контрольных животных (рис. 2Б).

Значения R_f для ФГ₁ и ФГ₂ составили 0.12 и 0.20, соответственно. Полученные результаты свидетельствуют, что развитие сахарного диабета 1 типа, в отличие

от некоторых типов онкологий [3] не связано с блокированием одной из форм ФГ.

Для выяснения субклеточной локализации изоформ фумаратгидратазы было проведено изоплотностное центрифугирование с последующим определением активности ФГ. Результаты представлены в таблице 2, из которой видно, что исследуемый фермент функционирует в цитоплазматической и митохондриальной фракциях. Перекрестное загрязнение составило порядка 4-5%, что считается приемлемым для интерпретации данных.

Полученные результаты по внутриклеточному распределению активности ФГ согласуются с литературными данными. Известно, что митохондриальная форма

Таблица 2. Удельная активность фумаратгидратазы в различных компартментах печени здоровых крыс (Норма) и животных с аллоксановым диабетом (Диабет), $p \leq 0.05$

Table 2. Specific activity of fumarate hydratase in various liver compartments of healthy rats (Norm) and animals with alloxan diabetes (Diabetes), $p \leq 0.05$

Показатель	Норма	Диабет
Активность ФГ в цитоплазме, Е / мг белка	0.31 ± 0.05	0.53 ± 0.03
Активность ФГ в митохондриях, Е / мг белка	0.64 ± 0.07	0.92 ± 0.05
Активность ФГ в пероксисомах, Е / мг белка	-	-

фермента участвует в цикле трикарбоновых кислот [20], а цитоплазматическая утилизирует фумарат, образуемый в орнитинном цикле, а также играет важную роль в катаболизме аминокислот [21, 22].

Заключение

Таким образом, проведение многоступенчатой схемы очистки с использованием ионообменной хроматографии в качестве заключительного этапа, позволило получить высокоочищенные препараты малатдегидрогеназы из печени здоровых крыс с удельной активностью 30.3 и 35.5 Е/мг белка, степенью очистки 77.8 и 83.3 и выходом 14 и 20%, соответственно. Препарат МДГ с наибольшей активностью использовали в качестве вспомогательного фермента для проявления изоформ фумаратгидратазы из печени здоровых крыс и животных с аллоксановым диабетом. Выявлено, что при развитии патологии изменений в изоферментном составе ФГ не наблюдается. Интересно, что ранее нами было показано увеличе-

ние активности фумаратгидратазы в печени крыс с аллоксановым диабетом по сравнению с контролем [23]. Вероятно, активизация фермента происходит за счет усиления работы уже имеющихся форм ФГ. Анализ субклеточной локализации ФГ в печени крыс показал, что ее изоформы функционируют в цитоплазматической и митохондриальной фракциях, причем в условиях аллоксанового диабета наблюдается активизация обеих форм фермента, что, вероятно, связано с ускорением метаболических процессов, в которых участвует фумараза. Однако точные причины ее роста не до конца понятны и требуют более детального изучения.

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.

Список литературы/References

1. Yogev O, Naamati A, Pines O. Fumarase: a paradigm of dual targeting and dual localized functions, *FEBS J*, 2011; 278: 4230-4242.
2. Kobayashi K., Tuboi S. End group analysis of the cytosolic and mitochondrial fumarases from rat liver, *J Biochem*, 1983; 94(3): 707-713. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134410>
3. Tomlinson I.P., Alam N.A., Rowan A.J., Barclay E., Jaeger E.E., Kelsell D., Leigh I., Gorman P., Lamlum H., Rahman S., Roylance R.R., Olpin S., Bevan S., Barker K., Hearle N., Houlston R.S., Kiuru

- M., Lehtonen R., Karhu A., Vilkki S., Laiho P., Eklund C., Vierimaa O., Aittomäki K., Hietala M., Sistonen P., Paetau A., Salovaara R., Herva R., Launonen V., Aaltonen L. A. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer, *Nat Genet*, 2002; 30: 406-410. <https://doi.org/10.1038/ng849>
4. Zheng L., Cardaci S., Jerby L., MacKenzie E.D., Sciacovelli M., Johnson T.I., Gaude E., King A., Leach J.D., Edrada-Ebel R., Hedley A., Morrice N.A., Kalna G., Blyth K., Ruppin E., Frezza Ch., Gottlieb E.



- Fumarate induces redox-dependent senescence by modifying glutathione metabolism, *Nat Commun*, 2015; 6: 6001. <https://doi.org/10.1038/ncomms7001>
5. Tuboi S., Suzuki T., Sato M., Yoshida T. Rat liver mitochondrial and cytosolic fumarases with identical amino acid sequences are encoded from a single mRNA with two alternative in-phase AUG initiation sites, *Adv Enzyme Regul*, 1990; 30: 289-304.
6. Yogev O., Yogev O., Singer E., Shaulian E., Goldberg M., Fox T.D., Pines O. Fumarase: a mitochondrial metabolic enzyme and a cytosolic/nuclear component of the DNA damage response, *PLoS Biol*, 2010; 8: e1000328.
7. Ternette N., Yang M., Laroyia M., Kitagawa M., O'Flaherty L., Wolhuter K., Igarashi K., Saito K., Kato K., Fischer R., Berquand A. Kessler B.M., Lappin T., Frizzell N., Soga T., Adam J., Pollard P.J. Inhibition of mitochondrial aconitase by succination in fumarate hydratase deficiency, *Cell Rep*, 2013; 3: 689-700. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.02.013>
8. Eprintsev A.T., Popov V.N., Shevchenko M.Yu. Gliksilatnyj cikl: universal'nyj mekhanizm adaptacii? Moskva, Akademkniga. 2007. 228 p. (In Russ.)
9. Tsou K.-C., Cheng C.-S., NacnlaS M.M., Seligman A.M. Syntheses of some p-nitrophenyl substituted tetrazolium salts as electron acceptors for the demonstration of dehydrogenase, *J. Am. Chem. Soc.*, 1956; 78: 6139.
10. Nisimoto Y., Wilson E., Heyl B.L., Lambeth J.D. NADH dehydrogenase from bovine neutrophil membranes: Purification and properties, *Journal of Biological Chemistry*, 1986; 261(1): 285-290. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)42467-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)42467-7)
11. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Sazonova O.V., Igamberdiev A.U. Expression and properties of the mitochondrial and cytosolic forms of fumarase in sunflower cotyledons, *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018; 129: 305-309
12. Selivanova N.V., Moiseenko A.V., Bakarev M.YU., Eprincev A.T. Ispol'zovanie ionoobmennoj hromatografii na DEAE-cellyuloze dlya razdeleniya izofermentov malatdegidrogenazy iz gepatocitov krysa v norme i pri alloksanovom diabete, *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2021; 21(4): 568-576. <https://doi.org/10.17308/sorp-chrom.2021.21/3641>
13. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes, *Diabetologia*, 2008; 51(2): 216-226. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0886-7>
14. Selemenev V.F., Hohlov V.YU., Bobreshova O.V., Aristov I.V. i dr. Fiziko-himicheskie osnovy sorbtsionnyh i membrannyh metodov vydeleniya i razdeleniya aminokislot. M. Stelajt. 2002. 299 p. (In Russ.)
15. Eprincev A. T., Fedorin D. N., Selivanova N. V., Vu T. L., Mahmud A. S., Popov V. N. Rol' metilirovaniya promotorov v regulyacii genov sukcinatdegidrogenazy v prorostkah kukuruzy, *Fiziol. Rast*; 2012; 59(3): 332-340. (In Russ.)
16. Nadeem M.S., Khan J.A., Murtaza B.N., Muhammad Kh., Rauf A. Purification and Properties of Liver Catalase from Water Buffalo (*Bubalus bubalis*), *South Asian Journal of Life Sciences*, 2015; 3(2): 51-55. <https://doi.org/10.14737/JOUR-NAL.SAJLS/2015/3.2.51.55>
17. Jelski W., Laniewska-Dunaj M., Orywal K., Kochanowicz J., Rutkowski R., Szmitkowski M. The Activity of Alcohol Dehydrogenase (ADH) Isoenzymes and Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) in the Sera of Patients with Brain Cancer, *NeurochemRes*, 2014; 39: 2313-2318. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1402-3>
18. Williams D.E., Reisfeld R.A., Disc electrophoresis in polyacrylamide gels: extension to new conditions of ph and buffer, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1964; 121(2): 372-381. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1964.tb14210.x>



19. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Starinina E.V., Igamberdiev A.U. Expression and properties of the mitochondrial and cytosolic forms of fumarase in germinating maize seeds. *Physiologia Plantarum*, 2014; 152: 231-240. <https://doi.org/10.1111/ppl.12181>

20. Tuboi S., Suzuki T., Sato M., Yoshida T. Rat liver mitochondrial and cytosolic fumarases with identical amino acid sequences are encoded from a single mRNA with two alternative in-phase AUG initiation sites, *Adv Enzyme Regul*, 1990; 30: 289-304.

21. Ratner S., Anslow W. P., Jr, Petrack B. Biosynthesis of urea. VI. Enzymatic

cleavage of argininosuccinic acid to arginine and fumaric acid, *J Biol Chem*, 1953; 204: 115-125.

22. Ravdin R. G., Crandall D. I. The enzymatic conversion of homogentisic acid to 4-fumarylacetoacetic acid, *J Biol Chem*, 1951; 189: 137-149.

23. Anichkina A.G., Alekseeva E.R., Gabrielyan N.G., Kulikova M.A., Perova S.A., Kalikina A.M. Aktivnost' akonitatgidratazy i fumaratgidratazy v pecheni krysa pri alloksanovom diabete, *Organizaciya i regulyaciya fiziologo-biohimicheskikh processov*, 2022; 24: 30-33. (In Russ.)

Информация об авторах / Information about the authors

Н.В. Селиванова – к.б.н., доцент кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

М.Ю. Бакарев – аспирант кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Д.С. Быстрова – магистрант кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

А.Т. Епринцев – д.б.н., проф., зав. кафедрой биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

N.V. Selivanova – Ph.D of Biology, docent of Department of Biochemistry and Physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: kir2202@yandex.ru

M.Yu. Bakarev – graduate student of Department of Biochemistry and Physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: max15111@mail.ru

D.S. Bystrova – Master's student of the Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

A.T. Eprintsev – Doctor of Biology, head of Department of Biochemistry and Physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Статья поступила в редакцию 09.01.2023; одобрена после рецензирования 22.02.2023; принята к публикации 1.03.2023.

The article was submitted 09.01.2023; approved after reviewing 22.02.2023; accepted for publication 1.03.2023.