



## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья  
УДК 577.152.4  
doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11578

### Выделение и очистка изоцитратлиазы хроматографическими методами из печени крыс в условиях аллоксан-индуцированного диабета

Наталья Владимировна Селиванова,  
Михаил Михайлович Винокуров, Александр Трофимович Епринцев<sup>✉</sup>  
Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, bc366@bio.vsu.ru<sup>✉</sup>

**Аннотация.** С использованием хроматографических методов был получен гомогенный препарат, обладающий изоцитратлиазной активностью из пероксисомальной фракции гепатоцитов крыс. В качестве объекта исследования использовались самцы лабораторных крыс (*Rattus norvegicus*) линии Вистар. Экспериментальный диабет индуцировали однократной инъекцией 5% раствора аллоксана. Контроль за развитием диабета осуществляли по измерению уровня глюкозы в крови с помощью глюкометра (СателлитПлюс ПКГ-02.4). Забор крови осуществлялся в утренние часы из хвостовой вены. На 10 день эксперимента лабораторные животные были подвержены декапитации, предварительно усыпленные эфирным наркозом, для получения образцов печеночной ткани. Для выделения гомогенного препарата изоцитратлиазы (ИЦЛ, КФ 4.1.3.1.) были использованы хроматографические методы. Очистка включала несколько стадий: фракционирование гомогената сульфатом аммония, гель-фильтрацию на колонках, заполненных сефадексом G-25 и ионообменную хроматографию, являющуюся определяющей стадией. В качестве сорбента использовался анионообменник ДЭАЭ-Sephacel. Это позволило достичь степень очистки для первой изоформы ИЦЛ 12.12 и 24.24 – для второй. Удельная активность для первого препарата составила 0.04 Е/мг белка, а выход – 26.3%. Значение удельной активности для второй формы ИЦЛ было 0.08 Е/мг белка, а выход – 47.4%. Для элюции с колонки, заполненной ДЭАЭ-Sephacel использовался ступенчатый градиент градиент КС1 (60 мМ – 200 мМ). Идентификацию полученных препаратов осуществляли спектрофотометрически, за счет увеличения оптической плотности, по методу Корнберга ( $\lambda$ -324 нм). Наличие изоформ определяли путем специфического окрашивания геля после электрофореза в ПААГ. В результате четырехстадийной очистки было получено две изоформы с отличной от ИЦЛ (КФ 4.1.3.1) из других источников электрофоретической подвижностью.

**Ключевые слова:** изоцитратлиаза, глиоксилатный цикл, экспериментальный диабет, ионообменная хроматография, аллоксан.

**Для цитирования:** Селиванова Н.В., Винокуров М.М., Епринцев А.Т. Выделение и очистка изоцитратлиазы хроматографическими методами из печени крыс в условиях аллоксан-индуцированного диабета // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2023. Т. 23, № 4. С. 716-722. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11578>

Original article

### Isolation and purification of isocitrate lyase by chromatographic methods from the liver of rats under conditions of alloxan-induced diabetes

Natalia V. Selivanova, Mikhail M. Vinokurov, Alexander T. Eprintsev<sup>✉</sup>  
Voronezh State University, Voronezh, Russia, bc366@bio.vsu.ru<sup>✉</sup>

**Abstract.** The homogeneous preparation with isocitrate lyase activity was obtained from the peroxisomal fraction of rat hepatocytes using chromatographic methods. Male white inbred laboratory Wistar rats (*Rattus*



*norvegicus*) were used as the object of the study. Experimental diabetes was induced by a single injection of a 5% alloxan solution. The development of diabetes was monitored by measuring blood glucose levels using a glucometer (SatellitePlus PKG-02.4). Blood sampling was carried out in the morning from the tail vein. On the 10th day of the experiment, laboratory animals were subjected to decapitation, previously euthanized with ether anaesthesia, to obtain liver tissue samples. For the isolation of a homogeneous preparation of isocitrate lyase (ICL, EC 4.1.3.1.), chromatographic methods were used. Purification included several stages: fractionation of the homogenate with ammonium sulphate, gel filtration on columns filled with Sephadex G-25 and ion exchange chromatography, which was the determining stage. The anion exchanger DEAE-Sephacel was used as a sorbent. This allowed to achieve a degree of purification of 12.12 for the first ICL isoform and 24.24 for the second ICL isoform. The specific activity for the first sample was 0.04 U/mg protein, and the yield was 26.3%. The specific activity value for the second form of ICL was 0.08 U/mg protein, and the yield was 47.4%. For elution from a column filled with DEAE-Sephacel was performed using step KCl gradient (60 mM – 200 mM). Identification of the resulting preparations was carried out spectrophotometrically, following the increase in the optical density, according to the Kornberg method ( $\lambda$ -324 nm). The presence of isoforms was determined by specific staining of the gel after PAGE electrophoresis. As a result of four-step purification, two isoforms with different from ICL (EC 4.1.3.1) from other sources electrophoretic mobility were obtained.

**Keywords:** isocitrate lyase, glyoxylate cycle, experimental diabetes, ion exchange chromatography, alloxan

**For citation:** Selivanova N.V., Vinokurov M.M., Eprintsev A.T. Isolation and purification of isocitrate lyase by chromatographic methods from the liver of rats under conditions of alloxan-induced diabetes. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2023. 23(4): 716-722. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11578>

## Введение

Гомеостаз является одним из важнейших свойств организма, характеризующийся относительным постоянством внутренней среды вне зависимости от внешних воздействий. При различных стрессовых ситуациях происходят сдвиги в метаболизме, что позволяет компенсировать нарушенные функции органов и тканей. Одним и наиболее интересным из таких механизмов является активация глюконеогенеза у млекопитающих в период длительного голодания или различных патологиях, так как именно глюкоза является наиболее востребованным источником энергии [1]. В качестве субстратов глюконеогенеза используются такие неуглеводные вещества, как лактат, глицерол и некоторые аминокислоты [2]. Но для длительного поддержания гликемии на физиологическом уровне в стрессовых условиях этого может быть недостаточно. В связи с этим были высказаны предположения о том, что в процесс глюконеогенеза могут вовлекаться и жирные кислоты [3]. Однако для этого необходимо наличие глиоксилатного пути, позволяющего преобразовать жирные кислоты в активный ацетат с последующим

его вовлечением в процесс глюконеогенеза [3, 4].

Ключевыми энзимами глиоксилатного цикла являются изоцитратлиаза (КФ 4.1.3.1) и малатсинтаза (КФ 2.3.3.9). Их строение и функционирование изучалось на растениях, микроорганизмах, низших животных [4]. Однако возможность их экспрессии и функционирования у млекопитающих вызывает много споров среди специалистов [5-7]. Также были проведены исследования, которые показали, что глиоксилат, являющийся промежуточным метаболитом в данном пути может быть использован в качестве ранней диагностики сахарного диабета [8]. Таким образом целью данной работы было получения с помощью хроматографических методов гомогенного препарата с изоцитратлиазной активностью и исследование изоферментного состава фермента у млекопитающих.

## Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования использовались самцы лабораторных крыс (*Rattus norvegicus* L.) линии Вистар (n=8), массой примерно 180-200 г. Для создания модели экспериментального диабета применялся 5% раствор аллоксана в 0.9%-ном растворе цитрате натрия (время

предварительной инкубации составляло 15 минут при температуре 37<sup>0</sup>С). Инъекции осуществлялись однократно, внутрибрюшинно, контрольным крысам вместо аллоксана вводили физ.раствор. Все крысы выращивались в одинаковых условиях при идентичном пищевом режиме. Развитие экспериментального диабета наблюдали по изменению уровня гликемии в крови. Для этого использовали глюкометр «Сателлит Плюс ПКГ-02.4» (Россия). Забор крови осуществлялся в утренние часы из хвостовой вены.

Изоцитратлиазную активность измеряли фотометрически, за счет роста оптической плотности при  $\lambda$ -324 нм. Среда спектрофотометрирования содержала 50 мМ TrisHCl (pH 7.5); 5 мМ MgCl<sub>2</sub>; 5 мМ изоцитрат Na; 4 мМ фенилгидрозин солянокислый; 4 мМ ДТТ [4]. Реакцию запускали добавлением ферментного препарата.

Содержание белка на каждой стадии определяли методом Лоури [9]. Все стадии очистки проводились при температуре не выше 4<sup>0</sup>С.

Гомогенизация. Печень гомогенизировали на льду в соотношении 1:5. Среда выделения включала: 50 мМ Tris-HCl (pH 7.5); 4 мМ MgCl<sub>2</sub>; 3 мМ ДТТ; 3 мМ ЭДТА. Последующее центрифугирование проводилось при 5000 об/мин 7 мин. После отбирали супернатант для дальнейшей очистки.

Фракционирование (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. К супернатанту добавляли кристаллический сульфат аммония до 30% насыщения, с последующим центрифугированием 30 мин при 11000 об/мин. Затем супернатант фракционировали до 90% насыщения и центрифугировали 30 мин при 11000 об/мин. Осадок ресуспендировали в среде выделения.

Гель-фильтрация. Полученный препарат наносили на колонку, заполненную сефадексом G25, для очистки от низкомолекулярных примесей и солей. Элюировали 50 мМ Tris-HCl буфером (pH 7.5), содержащим 1 мМ MgCl<sub>2</sub> и 1 мМ ДТТ.

Скорость элюирования составляла 1 см<sup>3</sup> – 1 минута. Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-сефацел. Ферментный препарат наносили на колонку, предварительно уравновешенную 50 мМ Tris-HCl (pH 7.5). Для десорбции применяли ступенчатый градиент KCl от 50 мМ до 200 мМ в 20 мМ Tris-HCl (pH 7.8). Скорость элюирования составляла 2 см<sup>3</sup> – 5 минут.

Электрофоретическое исследование. Электрофорез проводили в 8% полиакриламидном геле [10]. Для изучения изоферментного состава использовали специфическое окрашивание. Среда проявления содержала: 50 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ЭДТА, 3 мМ ДТТ, 10 мМ изоцитрат калия и реактив Шиффа [4]. Время инкубации составляло 12 часов при температуре 37<sup>0</sup>С.

Все опыты проводились в четырехкратной биологической и трехкратной аналитической повторностях. Для оценки достоверности полученных результатов использовали программу Статтех (<https://stattech.ru/>).

### Обсуждения результатов

Перед индукцией экспериментального диабета все крысы (n = 8) были произвольно разделены на две группы: «Контроль» – здоровые крысы; и «Диабет» – животные с аллоксановым диабетом. Изначально концентрация сахара в крови у всех крыс находилась в пределах нормы и составляла 5.1±0.23 ммоль/дм<sup>3</sup>. На 2 день после инъекции аллоксана у крыс группы «Диабет» уровень глюкозы резко повысился до 9.8±0.15 ммоль/дм<sup>3</sup> и на протяжении всего эксперимента находился в пределах 14-18 ммоль/дм<sup>3</sup> (рис. 1). Это свидетельствует о токсичном воздействии экзогенного аллоксана, посредством которого происходила постепенная деструкция  $\beta$ -клеток островков Лангерганса, с последовательно развивающейся гипергликемией [11]. У контрольной группы животных на протяжении всего

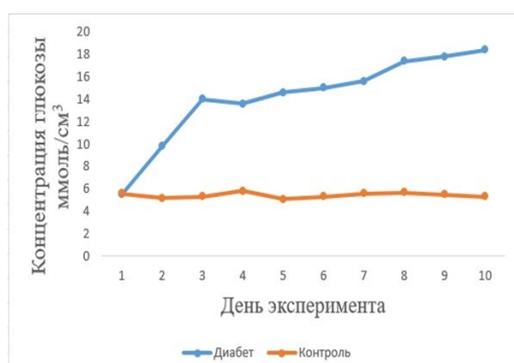


Рис. 1. Динамика концентрации глюкозы в плазме крови

Fig. 1. Dynamics of glucose concentration in blood plasma



Рис. 2. Электрофореграмма ПААГ со специфическим проявлением полученных препаратов из печени крыс с экспериментальным диабетом. P1, P2 – белковые полосы, F – фронт красителя.

Fig. 2. Electrophoregram PAAG with a specific manifestation of the preparations obtained from the liver of rats with experimental diabetes. P1, P2 are protein bands, F is the front of the dye.

Таблица. Очистка ИЦЛ из гепатоцитов крыс, подвергшихся инъекции аллоксаном ( $p \leq 0.001$ )  
 Table. Purification of ICL from hepatocytes of rats injected with alloxan ( $p \leq 0.01$ )

Стадия очистки	Объем, см <sup>3</sup>	Общий белок, мг	Общая активность, Е	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	3.7	57.45	0.19	0.0033	100	1
Высаливание сульфатом аммония	2.0	19.6	0.062	0.0032	32.6	0.97
Гель-фильтрация на G-25	1.8	17.2	0.245	0.006	128.9	4.48
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-сефацел	2.0	1.23	0.05	0.04	26.3	12.12

времени эксперимента данный показатель колебался в пределах 4.8-5.5 ммоль/дм<sup>3</sup>.

Для получения ткани печени лабораторные животные подвергались декапитации с последующей аутопсии под эфирным наркозом [12]. Для получения высокоочищенного препарата, обладающего изоцитратлиазной активностью, была проведена четырехстадийная очистка фермента. В опытных пробах после элюции фермента с ДЭАЭ-Sephacel ступенчатым градиентом KCl (50-200

мМ) были получены два ферментных препарата, обладающих изоцитратлиазной активностью. В первой опытной пробе удельная активность составила 0.04 Е/мг белка, вместе с тем степень очистки составила 12.12 раз, а выход 26.3%. Для второй пробы удельная активность составила 0.08 Е/мг белка, а степень очистки и выход 24.24 раза и 47.4% соответственно. В печени крыс группы «Контроль» активность изоцитратлиазы не обнаружена (таблица 1). Применение

ступенчатого градиента во время десорбции ферментных препаратов позволило выявить небольшое различие в степени сорбции двух препаратов на ДЭАЭ-Sephacel. Это обусловлено различиями в изоэлектрической точке (pI). Колонка с ДЭАЭ-Sephacel была уравновешена буфером с рН 7.8, что выше pI исследуемого энзима. В результате это способствовало формированию отрицательного заряда и элюции двух изоформ.

С помощью диск-электрофореза в ПААГ со специфическим окрашиванием было продемонстрировано наличие 1 полосы в каждом из двух ферментных препаратов. Электрофоретическая подвижность обоих препаратов существенно отличается от ИЦЛ, полученной из других источников. Полученный препарат ИЦЛ может быть использован для более детального исследования структурных особенностей и кинетических характеристик.

### Заключение

Несмотря на то, что в качестве субстратов, глюконеогенез может использовать различные вещества (пируват, лактат, глицерол, гликогенные аминокислоты), ни одно из них не было идентифицировано как доминирующее. Помимо этого, они не способны обеспечить длительную работу глюконеогенеза в стрессовых условиях. В связи с этим, должен существовать неизвестный источник, способный поддерживать длительную гипергликемию [7]. Так же было продемонстрировано, что повышение уровня сво-

### Список литературы

1. Кулебякин К.Ю., Акопян Ж.А., Кочегура Т.Н., Пеньков Д.Н. Механизмы транскрипционного контроля обмена глюкозы в печени // *Сахарный диабет*. 2016. Т. 19, № 3 С. 190-198.
2. Hanson R.W., Owen O.E., Gluconeogenesis // *Encyclopedia of Biological Chemistry*. 2013. P. 381-386.
3. Lazarow P.B., Peroxisomes // *Encyclopedia of cell Biology*. 2016. Vol. 2. P. 48-272.

бодных жирных кислот в плазме оказывает стимулирующее действие на глюконеогенез [13].

В ряде исследований была продемонстрирована тесная связь между активацией процессов  $\beta$ -,  $\omega$ -окисления и глиоксилатным путем [7]. За счет повышенной активности  $\beta$ - и  $\omega$ -окисления, обусловленных голоданием или притоком жира, происходит выработка свободного ацетата, который является мощным индуктором глиоксилатного пути. Для активного функционирования данного цикла необходимы два ключевых фермента – изоцитратлиаза и малатсинтаза.

Благодаря использованию хроматографических методов были получены два ферментных препарата обладающих изоцитратлиазной активностью [14]. Появление активности ИЦЛ в печени крыс с экспериментальным диабетом связано с появлением двух изоформ, имеющих разную электрофоретическую подвижность от ИЦЛ, выделенной ранее [4]. Мы предполагаем, что это может быть связано с наличием у млекопитающего другого энзима, способного в стрессовых условиях катализировать реакцию превращения изоцитрата в глиоксилат и сукцинат.

### 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.

4. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Шевченко М.Ю. Глиоксилатный цикл: универсальный механизм адаптации? М.: Академкнига. 2007. 228 с.
5. Попов В.Н., Волвенкин С.В., Епринцев А.Т., Игамбердиев А.У. Индукция ферментов глиоксилатного цикла в различных тканях голодающих крыс // *Известия РАН, серия биологическая*. 2000. № 6. С. 663-667.
6. Шевченко М.Ю. Дисс. Канд. Биол. Наук. Воронеж, 2007, 24 с



7. S. Song, Can the glyoxylate pathway contribute to fat-induced hepatic insulin resistance? // *Medical Hypotheses*. 2000. Vol. 54. P. 739-747.
8. Nikiforova V.J., Giesbertz P., Wiemer J. Glyoxylate, a new marker metabolite of type 2 diabetes. // *J. Diabetes Res*. 2014. Vol. 2014. P. 1-10.
9. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. // *Journal Biological Chemistry*. 1951. Vol. 193. P. 265-275.
10. Wilson K. and Walker J. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. 2010. 930 p.
11. Lenzen S., The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes // *Diabetologia*. 2008. Vol. 51. P. 216-226.
12. Коптяева К.Е., Мужикян А.А., Гушин Я.А., Беляева Е.В., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Методика вскрытия и извлечения органов лабораторных животных (крысы). // *Лабораторные животные для научных исследований*. 2018. №2. С. 71-92.
13. Clore J.N., Glickman P.S., Helm S.T., Nestler J.E., Blackard W.G. Evidence for dual control mechanism regulating hepatic glucose output in nondiabetic men // *Diabetes*. 1991. Vol. 40. P. 1033-1040.
14. Селеменев В.Ф., Хохлов В.Ю., Бобрешова О.В., Аристов И.В. Физико-химические основы сорбционных и мембранных методов выделения и разделения аминокислот. М. Стелайт. 2002. 299 с.
3. Lazarow P.B. Peroxisomes. *Encyclopedia of cell Biology*. 2016; 2: 48-272
4. Eprincev A.T. Glioksilatnyj cikl: universal'nyj mehanizm adaptacii? / A.T. Eprincev, V.N. Popov, M.Ju. Shevchenko. М., ИК «Академкнига», 2007, 228 p.
5. Popov V.N., Volvenkin S.V., Eprincev A.T., Igamberdiev A.U. Indukcija fermentov glioksilatnogo cikla v razlichnyh tkanjah golodajushhih krys. *Izvestija RAN, serija biologicheskaja*. 2000; 6: 663-667. (In Russ.)
6. Shevchenko M.Yu. Diss. Kand. Bio. Nauk. Voronezh, 2007, 24 p.
7. S. Song, Can the glyoxylate pathway contribute to fat-induced hepatic insulin resistance? *Medical Hypotheses*. 2000; 54: 739-747
8. Nikiforova V.J., Giesbertz P., Wiemer J. Glyoxylate, a new marker metabolite of type 2 diabetes. *J. Diabetes Res*. 2014; 2014: 1-10.
9. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*. 1951; 193: 265-275.
10. Wilson K. and Walker J. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. 2010. 930 p.
11. Lenzen S., The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008; 51: 216-226.
12. Коптяева К.Е., Мухикян А.А., Гушин Я.А., Беляева Е.В., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Методика вскрытия и извлечения органов лабораторных животных (крысы). *Лабораторные животные для научных исследований*. 2018; 2: 71-92. (In Russ.)
13. Clore J.N., Glickman P.S., Helm S.T., Nestler J.E., Blackard W.G. Evidence for dual control mechanism regulating hepatic glucose output in nondiabetic men. *Diabetes*. 1991; 40: 1033-1040. (In Russ.)
14. Selemenев V.F., Hohlov V.Ju., Bobreshova O.V., Aristov I.V. Физико-химические основы сорбционных и мембранных методов выделения и разделения аминокислот. М. Стелайт. 2002. 299 p.

### References

### Информация об авторах / Information about the authors

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

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



**Н.В. Селиванова** – к.б.н., доцент кафедры 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, Russia, e-mail: kir2202@yandex.ru

**М.М. Винокуров** – студент медико-биологического факультета, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

**M.M. Vinokurov** – student of the Faculty of Medicine and Biology, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: vinokurovm41@gmail.com

*Статья поступила в редакцию 13.02.2023; одобрена после рецензирования 27.04.2023; принята к публикации 03.05.2023.*

*The article was submitted 13.02.2023; approved after reviewing 27.04.2023; accepted for publication 03.05.2023.*