

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.151:543.544

doi: 10.17308/sorpchrom.2025.25/13444

Применение хроматографических методов для очистки аконитатгидратазы из сердца крыс с патологией и исследование некоторых каталитических свойств фермента

Евгений Дмитриевич Крыльский[✉], Татьяна Николаевна Попова,
Сергей Александрович Олейник, Данил Романович Беспалов

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, evgenij.krylsky@yandex.ru[✉]

Аннотация. В ходе настоящей работы была проведена оценка ряда каталитических и регуляторных свойств ферментного препарата цитоплазматической фракции аконитатгидратазы (АГ, КФ 4.2.1.3), очищенного с использованием гель-фильтрации и ионообменной хроматографии из сердца крыс (*Rattus norvegicus* линии Wistar) с диклофенак-индуцированным повреждением миокарда, получавших дипиколиновую кислоту (ДПК). Были сформированы три экспериментальные группы животных. Крысам контрольной группы с 15 дня эксперимента вводили внутрибрюшинно физиологический раствор на протяжении 7 дней. Вторая группа животных в первый день получала 100 мкл адьюванта Фрейнда, однократно, в левую подошвенную поверхность задней лапы путем подкожной инъекции. Затем с 15 дня животным внутрибрюшинно вводили диклофенак натрия в дозе 10 мг/кг в течение 7 дней. Третья группа животных параллельно с диклофенаком натрия получала внутривенно дипиколиновую кислоту в дозе 10 мг/кг массы тела. Сердце и сыворотку крови забирали через 24 часа после последней инъекции. Маркерные ферменты цитолиза кардиомиоцитов в сыворотке крови анализировали с помощью коммерческих наборов. Уровень окислительной модификации белков определяли по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином. Активность АГ исследовали спектрофотометрически при 235 нм. Разделение цитоплазматической и митохондриальной фракции осуществляли с помощью дифференциального центрифугирования. С применением методов фракционирования сульфатом аммония, гель-фильтрации через сефадексы G-25 и G-150, и ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе проводили очистку фермента из сердца крыс. В ходе работы была получена АГ цитоплазматической фракции из сердца крыс с диклофенак-индуцированным поражением миокарда с 120-кратной степенью очистки, а из сердца крыс, получавших на фоне патологии ДПК – со степенью очистки 122.1 раза. С применением метода двойных обратных координат Лайнуивера-Берка показано, что введение крысам ДПК сопровождалось восстановлением сродства фермента к цитрату и изоцитрату, по сравнению с показателями при патологии. Помимо этого, наблюдалось изменение в направлении контроля таких параметров ферментативной реакции, как температурный и pH-оптимум, а также энергия активации. Для АГ из сердца крыс с патологией, получавших ДПК, наблюдалось более выраженное увеличение активности фермента при внесении в реакционную среду восстановленного глутатиона, по сравнению с показателями у животных, получавших только диклофенак. Выявленные сдвиги свойств АГ могли быть связаны с изменениями структурных и регуляторных особенностей молекулы фермента на фоне снижения под действием ДПК интенсивности свободнорадикального окисления, развивающегося в результате воздействия диклофенака.

Ключевые слова: аконитатгидратаза, диклофенак, дипиколиновая кислота, миокард, окислительный стресс, гель-фильтрация, ионообменная хроматография.

Благодарности: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 25-25-00261).

Для цитирования: Крыльский Е.Д., Попова Т.Н., Олейник С.А., Беспалов Д.Р. Применение хроматографических методов для очистки аконитатгидратазы из сердца крыс с патологией и исследование некоторых каталитических свойств фермента // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2025. Т. 25, № 5. С. 759-769. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13444>

Original article

The application of chromatographic techniques for the purification of aconitate hydratase isolated from the hearts of rats with pathology, and the investigation of certain catalytic properties of this enzyme

Evgenii D. Kryl'skii[✉], Tatyana N. Popova, Sergey A. Oleynik, Danil R. Beshpalov

Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, evgenij.krylsky@yandex.ru[✉]

Abstract. In this study, we evaluated the catalytic and regulatory properties of an enzyme preparation derived from the cytoplasmic fraction of rat aconitate hydratase (AH, EC 4.2.1.3), which was purified using gel filtration and ion exchange chromatography. The enzyme preparation was derived from the hearts of rats (*Rattus norvegicus*, Wistar strain) that had undergone myocardial injury induced by diclofenac and treated with dipicolinic acid (DPA). Three groups of animals were used in the experiment. From the 15th day of the experiment, a saline solution was administered intraperitoneally to the rats in the control group for a period of 7 days. On the first day, animals in the second group received 100 µl of Freund's adjuvant subcutaneously into the left plantar surface of their hind paw. Thereafter, from the 15th day onwards, diclofenac sodium was given intraperitoneally at a dosage of 10 mg/kg body weight for a duration of 7 days. A third group of animals concurrently received intragastric administration of DPA at 10 mg/kg, along with diclofenac sodium. Heart and blood serum samples were collected 24 hours following the final injection. Commercial kits were used to analyze marker enzymes of cardiomyocyte cytolysis in the blood serum. The level of protein oxidative modification was determined through reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine. The activity of AH was measured spectrophotometrically at 235 nm. Separation of the cytoplasmic and mitochondrial fractions was performed using differential centrifugation. Purification of the enzyme from rat heart tissue was achieved through techniques such as ammonium sulfate precipitation, gel filtration using G-25 and G-150 sephadex columns, and ion exchange chromatography on KM-cellulose. During the course of this work, a cytoplasmic fraction with a 120-fold purification factor was isolated from the hearts of rats with myocardial damage induced by diclofenac, and a fraction with a purification factor of 122.1 was isolated from hearts of rats with pathology treated for DPA. Using the Lineweaver-Burke double inverse coordinate method, it has been demonstrated that the administration of DPA to rats resulted in a restoration of the enzyme's affinity for citrate and isocitrate compared to pathological indicators. In addition, there were changes in the control of parameters such as temperature, pH-optimum, and activation energy of the enzymatic reaction. For AH in the heart of pathologically treated rats, there was a more significant increase in enzyme activity when reduced glutathione was added to the reaction medium, compared to animals treated with diclofenac alone. The observed alterations in the properties of AH may be linked to changes in the structural and functional characteristics of the enzyme molecule. Such alterations could be a consequence of the antioxidant activity of DPA in response to oxidative stress induced by diclofenac treatment.

Key words: aconitate hydratase, diclofenac, dipicolinic acid, myocardium, oxidative stress, gel filtration, ion exchange chromatography.

Acknowledgments: the work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 25-25-00261).

For citation: Kryl'skii E.D., Popova T.N., Oleynik S.A., Beshpalov D.R. The application of chromatographic techniques for the purification of aconitate hydratase isolated from the hearts of rats with pathology, and the investigation of certain catalytic properties of this enzyme. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2025. 25(5): 759-769. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13444>

Введение

В настоящее время сердечно-сосудистые заболевания занимают ведущее место среди причин смертности по всему миру. Одним из факторов возникновения кардиоваскулярных нарушений выступает прием нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП), наиболее широко используемых лекарственных

средств, которые, однако, вызывают множество побочных эффектов [1]. Одним из наиболее часто применяемых НПВП является диклофенак, механизм действия которого связан с ингибированием фермента циклооксигеназы (ЦОГ) [2]. ЦОГ-1 и ЦОГ-2 метаболизируют арахидоновую кислоту с дальнейшим образованием простагландинов и тромбоксана, кото-

рые, помимо прочего, способствуют реализации воспалительной реакции [3]. Хотя диклофенак является неселективным ингибитором ЦОГ, он воздействует на ЦОГ-1 и ЦОГ-2 в разной степени [2], что нарушает баланс простагландинов и играет ключевую роль в патогенезе ишемического повреждения миокарда посредством развития вазоконстрикции коронарных сосудов, усиления тромбообразования и ухудшения перфузии миокарда [4]. В условиях дефицита кислорода митохондрии осуществляют неполное восстановление кислорода, что сопряжено с генерацией активных форм кислорода (АФК) и развитием окислительного стресса [5].

Одним из главных защитных компонентов, нейтрализующих АФК, является глутатионовое звено антиокислительной системы, активность ферментов которой зависит от наличия восстановленного глутатиона (GSH). GSH также играет непосредственную роль в защите клеток от окислительного стресса, нейтрализуя супероксидный анион-радикал и другие АФК, превращаясь в ходе этого в окисленный глутатион (GSSG) [6]. Имеются также сведения, что истощение GSH снижает выработку АТФ митохондриями, способствует запуску митохондриально-опосредованного пути апоптоза при ишемии [7] и играет значимую роль в развитии широкого ряда других заболеваний [8].

В условиях нарушения редокс-гомеостаза актуальной задачей является исследование функционирования ферментов окислительного метаболизма, участвующих как в обменных процессах, так и отражающих состояние окислительного статуса в клетках. К данным ферментам можно отнести аконитатгидратазу (аконитаза, К.Ф. 4.2.1.3; АГ), катализирующую реакцию обратимой изомеризации цитрата в изоцитрат. Для АГ известны цитоплазматическая и митохондриальная формы, которые различаются по физико-химическим и структурным свойствам и

выполняют различные физиолого-биохимические функции, что обуславливает амфиболическую роль АГ. Кроме того, АГ, за счёт наличия железо-серного кластера в активном центре, является мишенью действия свободных радикалов [9].

Исходя из частоты использования НПВП и имеющихся у них побочных эффектов, перспективным направлением может являться разработка способов более безопасного их применения, в частности, за счёт сочетанного приёма природных безопасных соединений. Дипиколиновая кислота (пиридин-2,6-дикарбоновая кислота, ДПК) – метаболит различных видов бактерий рода *Bacillus*, который является одним из основных компонентов спор [10]. ДПК является безопасным для человека соединением и содержится в натто, традиционном японском продукте из ферментированной сои. Было изучено влияние данного соединения на свертываемость крови, в ходе чего было обнаружено, что добавление ДПК приводит к существенному ингибированию агрегации тромбоцитов [11].

Таким образом, представляет интерес исследование регуляторных и каталитических свойств АГ из сердца крыс в условиях нарушения окислительного статуса, вызванного введением диклофенака, и корректирующего действия ДПК. Исходя из этого, целью настоящей работы стала очистка АГ с использованием ионообменной и гель-хроматографии, исследование её каталитических свойств, а также анализ регуляторного воздействия GSH на данный фермент из сердца крыс с диклофенак-индуцированным поражением миокарда, получавших ДПК.

Экспериментальная часть

В ходе исследования использовали крыс-самцов линии Вистар с массой тела 200-250 г, содержащихся при 12-часовом цикле свет/темнота и неограниченном доступе к воде и пище. Исследование на животных проводилось в соответствии с требованиями Этического комитета по

экспертизе биомедицинских исследований в ФГБОУ ВО «ВГУ» (протокол № 5001-01 от 11.11.2025) и в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС. Крысы были разделены на три группы по 8 животных в каждой. Группа 1 (Кон) с 15 дня эксперимента получала внутрибрюшинно физиологический раствор на протяжении 7 дней. Вторая группа животных (Дикл) в первый день получала 100 мкл адьюванта Фрейнда, однократно, в левую подошвенную поверхность задней лапы путем подкожной инъекции. Затем с 15 дня животным внутрибрюшинно вводили диклофенак натрия в дозе 10 мг/кг в течение 7 дней [12]. Третья группа животных (ДПК) параллельно с диклофенаком натрия получала внутрижелудочно дипиколоновую кислоту в дозе 10 мг/кг массы тела. Дозы тестируемого соединения были подобраны на основании дозировок аспирина, способного ингибировать агрегацию тромбоцитов, блокируя синтез тромбоксана А₂ [13]. Через двадцать четыре часа после последнего введения соединений крыс наркотизировали хлороформом, забирали образцы крови из сердца шприцом, предварительно промытым изотоническим раствором, с иглой размером 21G, а также сердце для биохимического анализа.

Активность креатинкиназы МВ (КК-МВ) и аспаратаминотрансферазы (АсАТ) в сыворотке крови определяли с помощью диагностических наборов Abris+ (Россия). Интенсивность окислительной модификации белков оценивали с помощью метода, основанного на взаимодействии карбонильных групп и аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, имеющих максимум поглощения при 370 нм [14]. Образец разбавляли 100 мМ фосфатным буфером (рН 7.4), затем добавляли 10 мм 2,4-ДНФГ, растворенного в 2.5 М НСl, смесь инкубировали в течение 1 ч, а затем добавляли

20%-ную трихлоруксусную кислоту. После охлаждения образцы центрифугировали при 3000 g, белковый осадок промывали 10%-ной трихлоруксусной кислотой и смесью этанола и этилацетата (1:1), а затем растворяли в 2 мл 8 М мочевины. Оптическую плотность экспериментального образца измеряли при длине волны 370 нм относительно контрольного образца, обработанного 2.5 М соляной кислотой. Для расчета содержания карбонильных аминокислотных групп в белках использовали молярный коэффициент экстинкции $\epsilon=22.000 \text{ см}^{-1}\text{М}^{-1}$. Активность АГ определяли спектрофотометрическим методом при 235 нм. Среда для анализа активности фермента представляла собой 50 мМ трис-НСl-буфер, рН 7.8, содержащий 0.15 мМ цитрат. Реакцию инициировали внесением исследуемого образца в спектрофотометрическую кювету. За единицу активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее превращение 1 мкмоль субстрата за 1 минуту при 25°C. С помощью набора BCA Protein Colorimetric Assay Kit (Elabscience, США) измеряли концентрацию белка.

Для разделения митохондриальной и цитоплазматической фракций сердце гомогенизировали в среде 50 мМ трис-НСl-буфера (рН 8.3), содержащего 1 мМ ЭДТА, 2 мМ β -меркаптоэтанол и 0.3 М сахарозу, после чего фракции разделяли с помощью дифференциального центрифугирования при 15 000 g в течение 15 минут. Для получения ферментных препаратов АГ из цитоплазматической фракции использовалась следующая схема очистки. На первом этапе проводили разделение белков сульфатом аммония $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ путем ступенчатого повышения концентрации данного соединения в цитоплазматической фракции от 0 до 40%, затем от 40 до 65%. Далее очистку осуществляли с помощью гель-фильтрации через сефадекс G-25 (1.4×20 см), ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе и гель-фильтрации через сефа-

декс G-150 (2.0×40 см). Образец наносили на сефадекс G-25 в количестве не более 20-25% от объема колонки, на сефадекс G-150 – в объеме не более 2%. Трис-НСl буфер (рН 7.8) 0,01 М использовали в качестве элюирующей среды. Скорость элюции составляла 30 мл/ч и 15 мл/ч на сефадексах G-25 и G-150 соответственно. Ферментативную активность оценивали в каждой фракции объемом 2 мл. Фракции, характеризующиеся максимальной активностью после хроматографии на сефадексе G-25 объединяли и использовали для дальнейшей очистки с использованием ионообменной хроматографии на колонке с КМ-целлюлозой (1.0×13 см). После сорбции белка использовали градиент концентрации KCl в среде элюции для десорбции АГ. Скорость элюции составляла 20-25 мл/час. Ферментативную активность и содержание белка анализировали в каждой фракции объемом 2 мл. Фракции с максимальной активностью фермента объединяли. Все этапы выделения и очистки фермента осуществляли при температуре 0-4°C. Константу Михаэлиса (Км) определяли методом двойных обратных координат Лайнуивера-Берка.

Электрофоретические свойства ферментного препарата оценивали методом диск-электрофореза в ПААГ по Дэвису. В качестве маркера движения молекул в ходе электрофореза использовали раствор бромфенолового синего. Окрашивание гелей на белок осуществляли 0.5 % кумасси голубым R-250 в течение 60 минут с последующим промыванием 7 % уксусной кислотой. Специфическое проявление АГ было основано на сопряженной реакции в результате переноса водорода от НАДФН на нитротетразолиевый синий при участии феназинметасульфата с образованием диформаза. Среда инкубации включала 200 мМ трис-НСl буфер рН 7.8, 0.5 мМ MnCl₂, 1 мМ НАДФ, 2.2 мг/мл цис-аконитата в 1 М трис-НСl буфере рН

9.5, 0.12 мг/мл нитротетразолиевого синего, 0.18 мг/мл феназинметасульфата и 0.2 мг/мл НАДФ-ИДГ (2 Е/мл).

Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения SPSS Statistics 23.0 с использованием критерия Колмогорова-Смирнова для оценки нормальности распределения переменных. Сравнение значений показателей между группами проводилось с использованием ANOVA или критерия Краскелла-Уоллиса. Парные сравнения проводились с использованием Т-критерия Стьюдента или критерия Манна-Уитни. Статистическая значимость определялась с использованием порогового значения $p < 0.05$. Количественные данные представлены в виде среднего значения + стандартное отклонение (SD).

Обсуждение результатов

Для анализа кардиопротекторных свойств ДПК была проведена оценка активности КК-МВ и АсАТ в сыворотке крови животных на фоне диклофенак-индуцированного повреждения миокарда. Кардиотоксичность, вызванная диклофенаком, приводила к значительному повышению активности исследуемых ферментов, что свидетельствует о повреждении клеток миокарда и последующем высвобождении внутриклеточного содержимого в кровотоки (рис. 1). Применение ДПК в дозе 10 мг/кг в качестве кардиопротектора у крыс с индуцированной кардиотоксичностью снижало повреждающее действие диклофенака на ткани сердца и способствовало нормализации активности КК-МВ и АсАТ. Судя по всему, свои позитивные эффекты ДПК оказывала за счет торможения тромбообразования и последующего улучшения кровоснабжения миокарда [11, 15].

Уровень карбонильных остатков аминокислот в белках ткани сердца в группе животных, получавших диклофенак, существенно увеличивался, что, вероятно,

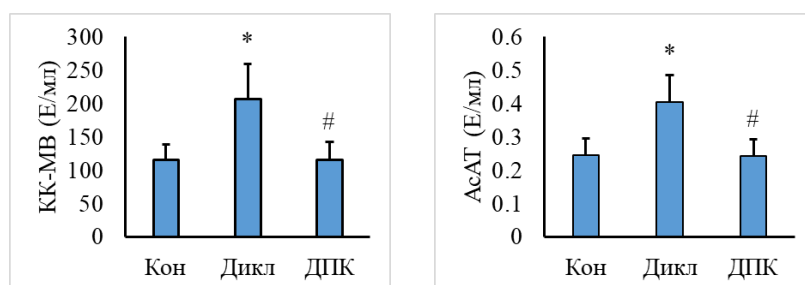


Рис. 1. Показатели активности креатин киназы-МВ (КК-МВ) и аспаратаминотрансферазы (АсАТ) в сыворотке крови контрольных крыс (Кон), животных с диклофенак-индуцированным повреждением миокарда (Дикл) и животных, которым на фоне развития патологии вводили дипикололиновую кислоту в дозе 10 мг/кг (ДПК). * - $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой; # - $p < 0.05$ по сравнению с группой животных с патологией.

Fig 1. Indicators of the activity of creatine kinase-MB (CK-MB) and aspartate aminotransferase (ASAT) in the blood serum of rats from the control group (Con), animals with diclofenac-induced myocardial injury (Dicl), and animals with a pathology which were administered dipicolinic acid at a dose of 10 mg/kg (DPA). * - $p < 0.05$ as compared to the control group; # - $p < 0.05$ as compared to the group of animals with a pathology

отражает усиление процессов свободно-радикального окисления (рис. 2). Наблюдалось также падение активности АГ, выраженной в Е/г сырой массы сердца и Е/мг белка. Применение ДПК в дозе 10 мг/кг способствовало снижению уровня окислительной модификации белков, а также увеличению активности АГ. Данные сдвиги, очевидно, были связаны с уменьшением выраженности окислительного стресса. Из литературы известно, что ДПК способна оказывать ингибирующее действие на железозависимое перекисное окисление липидов и опосредованную медью инактивацию глутатион-редуктазы. Механизм данного эффекта может заключаться в том, что пиридиновое кольцо ДПК имеет неспаренный электрон на атоме азота, и наличие карбоксильных групп во 2-м и 6-м положениях, оттягивающих электронную плотность, усиливает способность соединения принимать электроны. Таким образом, ДПК может забирать электроны у металлов с переходной валентностью, окисляя их и не давая вступать в реакции генерации свободных радикалов [16-18].

Поскольку большую часть активности АГ в клетке составляет её цитоплазматическая фракция [19], для дальнейших исследований было проведено выделение и очистка АГ из цитоплазмы клеток ткани

сердца экспериментальных животных с диклофенак-индуцированным поражением миокарда, получавших ДПК. Ферментный препарат АГ был получен методом фракционирования с использованием ступенчатого повышения концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Степень очистки после данной стадии составила 5.1 раза и 4.8 раза соответственно, в группе животных с патологией и группе животных, получавших наряду с диклофенаком ДПК (таблица 1). На следующей стадии с целью удаления низкомолекулярных примесей очистку ГР производили с использованием гель-фильтрации на сефадексе G-25. В дальнейшем применяли хроматографию на КМ-целлюлозе, в результате чего удалось получить ферментный препарат со степенью очистки 34.2 из сердца животных, получавших диклофенак и 35.6 раза у крыс, которым вводили ДПК на фоне патологии. В ходе эксперимента было установлено, что в процессе ионообменной хроматографии на колонке с КМ-целлюлозой фермент из сердца исследуемых животных десорбировался в виде максимального пика при нанесении на колонку 35 мл среды элюции 100 мМ KCl. На заключительной стадии очистки белковый раствор подвергали разделению на сефадексе G-150. Применение

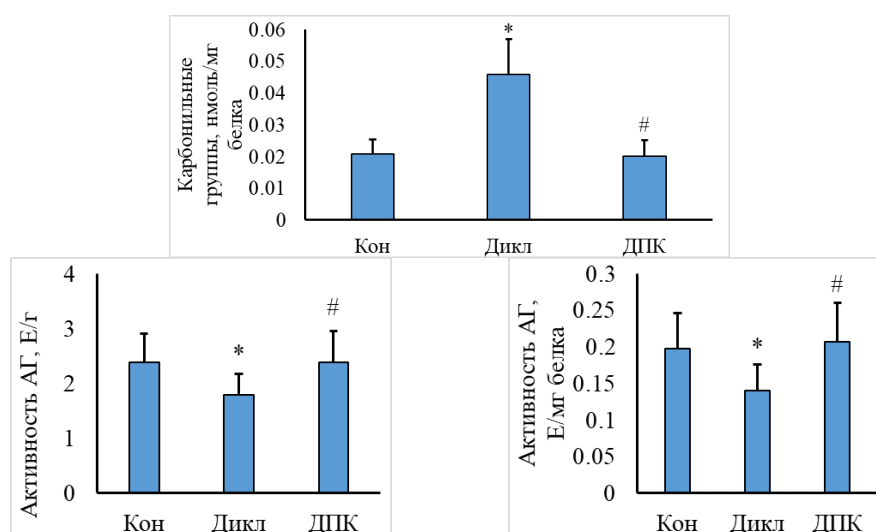


Рис. 2. Уровень карбонильных остатков аминокислот в белках и активность аконитатгидратазы (АГ), выраженная в Е/г ткани и Е/мг белка в сердце контрольных крыс (Кон), животных с диклофенак-индуцированным повреждением миокарда (Дикл) и животных, которым на фоне развития патологии вводили дипиколиновую кислоту в дозе 10 мг/кг (ДПК). * - $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой; # - $p < 0.05$ по сравнению с группой животных с патологией.

Fig 2. The level of carbonyl amino acid residue in proteins and the activity of aconitate hydratase (AH) expressed in U/g of tissue and U/mg of protein in the hearts of rats from the control group (Con), animals with diclofenac-induced myocardial injury (Dicl), and animals with a pathology which were administered dipicolinic acid at a dose of 10 mg/kg (DPA). * - $p < 0.05$ as compared to the control group; # - $p < 0.05$ as compared to the group of animals with a pathology.

данной стадии очистки позволило получить очищенные препараты АГ из сердца крыс с патологией и крыс, получавших на фоне диклофенака ДПК, в 120.0 и 122.1 раза соответственно. Конечные ферментные препараты АГ цитоплазматической фракции у животных данных экспериментальных групп имели удельную активность 9.6 и 12.3 Е/мг белка. Очищенный ферментный препарат служил объектом для анализа каталитических и регуляторных свойств.

В ходе работы была осуществлена оценка электрофоретических свойств очищенного ферментного препарата АГ. С помощью специфического окрашивания на активность были обнаружены две формы фермента в гомогенате сердца крыс всех экспериментальных групп с R_f 0.78 и 0.89. После электрофореза и специфического окрашивания на активность в цитоплазматической фракции была обнаружена одна форма АГ с R_f 0.78. Вторая

полоса отсутствовала или визуализировалась в следовых количествах, что могло быть связано с незначительным перекрестным загрязнением митохондриальной формой. При неспецифическом окрашивании очищенного препарата АГ у крыс всех экспериментальных групп проявлялась одна основная полоса с R_f 0.78, соответствующая цитоплазматической форме фермента.

В ходе проведенного исследования методом двойных обратных координат Лайнуивера-Берка удалось вычислить Константу Михаэлиса (Км) АГ по отношению к цитрату, которая составляла в контроле 66 мкМ, у животных с диклофенак-индуцированным поражением миокарда – 133 мкМ, а у крыс, которым на фоне развития патологии вводили ДПК – 83 мкМ (рис 3). Также для фермента из сердца животных данных групп был найдена Км по отношению к изоцитрату, которая составила соответственно 55, 125

Таблица 1. Очистка аконитатгидратазы из сердца крыс контрольной группы (Кон), животных с диклофенак-индуцированным повреждением миокарда (Дикл), и крыс, которым на фоне развития патологии вводили дипикололиновую кислоту в дозе 10 мг/кг (ДПК).

Table 1. Purification of aconitate hydratase from the hearts of rats of the control group (Con), animals with diclofenac-induced myocardial injury (Dicl), and animals with a pathology which were administered dipicolinic acid at a dose of 10 mg/kg (DCA)

Стадия очистки	Группа животных	Общая активность во фракции, Е	Количество белка во фракции, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Цитоплазматическая фракция	Кон	4.62±0.70	45.00±8.40	0.10±0.02	100	1.00
	Дикл	3.45±0.51	41.00±6.22	0.08±0.01	100	1.00
	ДПК	4.67±0.82	44.28±7.21	0.11±0.02	100	1.00
Фракционирование (NH ₄) ₂ SO ₄	Кон	2.32±0.41	4.55±1.12	0.51±0.09	50.20	5.10
	Дикл	1.72±0.26	4.16±1.06	0.41±0.08	49.85	5.13
	ДПК	2.39±0.48	4.49±0.86	0.53±0.11	51.18	4.82
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	Кон	2.30±0.32	4.53±1.01	0.51±0.08	49.80	5.10
	Дикл	1.68±0.30	3.95±0.82	0.43±0.06	48.69	5.38
	ДПК	2.31±0.46	4.40±0.91	0.53±0.12	49.46	4.82
Хроматография на КМ-целлюлозе	Кон	1.64±0.28	0.40±0.05	4.10±0.75	35.60	41.00
	Дикл	1.18±0.25	0.34±0.04	3.47±0.65	34.20	43.38
	ДПК	1.68±0.32	0.37±0.05	4.54±0.79	35.60	42.18
Гель-хроматография на G-150	Кон	0.73±0.14	0.06±0.02	12.2±2.15	15.69	122.00
	Дикл	0.48±0.09	0.05±0.01	9.60±2.09	13.91	120.00
	ДПК	0.74±0.17	0.06±0.02	12.33±2.39	15.85	122.09

и 59 мкМ (рис. 3). Наблюдаемое снижение сродства АГ к цитрату и изоцитрату при патологии, по-видимому, было сопряжено со снижением активности фермента, происходящим в результате повреждения его железо-серного кластера под действием АФК. В свою очередь, восстановление сродства АГ к цитрату и изоцитрату могло происходить в результате улучшения оксидативного статуса в ткани сердца под действием ДПК и восстановления активности АГ.

При определении температурного оптимума было найдено, что максимальная активность АГ, выделенной из цитоплазмы клеток сердца крыс с диклофенак-индуцированным поражением миокарда, проявляется при 35 °С – более низкой температуре, чем у фермента животных контрольной группы (рис. 4). Также показано снижение энергии активации

для АГ из сердца крыс с патологией, рассчитанной из графика Аррениуса в интервале температур 10-40 °С. Анализ зависимости скорости АГ-реакции от концентрации ионов водорода показал, что АГ цитоплазматической фракции сердца крыс с патологией характеризуется сдвигом рН оптимума в кислую сторону. Данные изменения могут являться следствием накопления восстановительных эквивалентов при угнетении окислительного фосфорилирования на фоне ишемии миокарда, вызванной активизацией тромбоза в результате введения диклофенака. Применение ДПК приводило к сдвигу температурного и рН оптимума в направлении контроля, что могло быть связано с нормализацией энергетического обмена за счет антитромботического действия ДПК и улучшения перфузии миокарда.

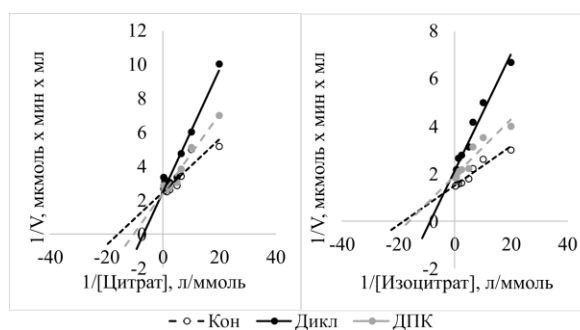


Рис. 3. Зависимость скорости реакции, катализируемой аконитатгидратазой, от концентрации цитрата и изоцитрата, представленная в двойных обратных координатах Лайнуивера-Берка, у контрольных крыс (Кон), животных с диклофенак-индуцированным поражением миокарда (Дикл), и крыс, которым на фоне развития патологии вводили дипиколиновую кислоту в дозе 10 мг/кг (ДПК).

Fig 3. Dependence (shown using the Lineweaver-Burk method of double inverse coordinates) of the rate of reaction catalysed by aconitate hydratase on the concentration of citrate and isocitrate in rats from the control group (Con), animals with diclofenac-induced myocardial injury (Dicl), and animals with a pathology which were administered dipicolinic acid at a dose of 10 mg/kg (DPA).

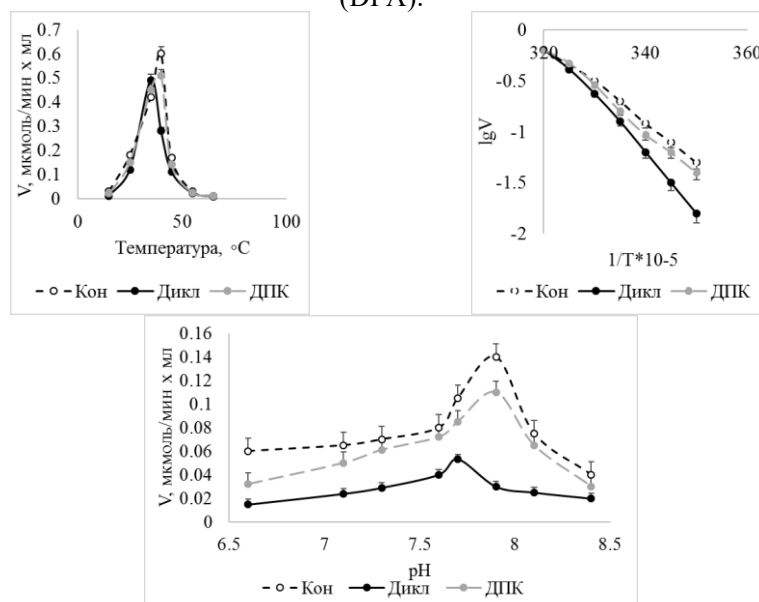


Рис. 4. Зависимость скорости реакции, катализируемой аконитатгидратазой, от температуры, концентрации ионов водорода, а также график Аррениуса в интервале температур 10-40 °C для фермента из сердца контрольных крыс (Кон), животных с диклофенак-индуцированным поражением миокарда (Дикл), и крыс, которым на фоне развития патологии вводили дипиколиновую кислоту в дозе 10 мг/кг (ДПК).

Fig 4. Dependence of the rate of reaction catalysed by aconitate hydratase on the temperature and the concentration of hydrogen ions. Arrhenius graph in the temperature range of 10-40 °C for the enzyme from the hearts of rats from the control group (Con), animals with diclofenac-induced myocardial injury (Dicl), and animals with a pathology which were administered dipicolinic acid at a dose of 10 mg/kg (DPA).

Как известно, при ишемии миокарда, в том числе вызванной тромбообразованием на фоне применения НПВП, важную роль в защите от окислительного стресса играет GSH, который в ходе восстановления реактивных молекул окисля-

ется до GSSG. В связи с этим, актуальным является анализ регуляторного влияния GSH на активность АГ из сердца крыс при диклофенак-индуцированном повреждении миокарда и введении ДПК. В ходе работы было выяснено, что активность фермента цитоплазматической

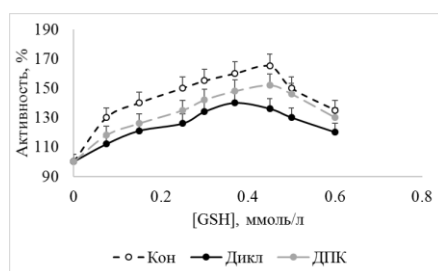


Рис. 5. Воздействие восстановленного глутатиона (GSH) на активность цитоплазматической аконитатгидратазы сердца контрольных крыс (Кон), животных с диклофенак-индуцированным поражением миокарда (Дикл), и крыс, которым на фоне развития патологии вводили дипиколиновую кислоту в дозе 10 мг/кг (ДПК).

Fig 5. Influence of reduced glutathione (GSH) on the activity and oxidised glutathione (GSSG) on the activity of cytoplasmic aconitate hydratase in the hearts of rats from the control group (Con), animals with diclofenac-induced myocardial injury (Dicl), and animals with a pathology which were administered dipicolinic acid at a dose of 10 mg/kg (DPA).

фракции из сердца крыс с патологией увеличивается с возрастанием концентрации GSH до 0.4 мМ, а из сердца крыс, получавших наряду с диклофенаком ДПК – до концентрации GSH 0.45 мМ (рис. 5). При этом, активность АГ из сердца крыс с патологией повышается на 38 %, а активность фермента из сердца крыс, получавших на фоне поражения миокарда ДПК – на 50 %, что представляет собой более близкие к показателям контрольной группы значения активности.

Таким образом, с использованием методов фракционирования сульфатом аммония, гель-фильтрации на сефадексах G-25 и G-150, и хроматографии на КМ-целлюлозе был получен высокоочищенный ферментный препарат АГ, который использовали для оценки каталитических и регуляторных свойств фермента в условиях воздействия ДПК на фоне диклофенак-индуцированного повреждения миокарда. Полученные данные показали, что ДПК изменяет ряд каталитических и регуляторных параметров АГ у животных с патологией, что сопровождается сдвигами соответствующих значений в направлении показателей контрольной группы. Выявленные изменения, судя по всему, были связаны с нормализацией оксидативного статуса, обусловленного улучшением перфузии миокарда за счёт антитромботического действия ДПК, а также способности данного соединения

тормозить процессы свободнорадикального окисления, что приводило к восстановлению активности и свойств АГ.

Заключение

В результате проведенных исследований был получен ферментный препарат АГ цитоплазматической фракции из сердца животных с диклофенак-индуцированным поражением миокарда со степенью очистки 120.0 раза, а также из сердца крыс, получавших на фоне патологии ДПК, со степенью очистки 122.1 раза, с применением методов фракционирования сульфатом аммония, гель-фильтрации на сефадексах G-25 и G-150, и ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе. Показано, что введение ДПК крысам с диклофенак-индуцированным поражением миокарда способствовало восстановлению сродства АГ к цитрату и изоцитрату. Помимо этого, происходило изменение в направлении контроля таких параметров ферментативной реакции, как температурный и pH-оптимум, а также энергия активации. Отмечено, что при добавлении в реакционную среду GSH активность АГ из сердца крыс, которым вводили ДПК на фоне патологии, увеличивалась более существенно, по сравнению с показателями при диклофенак-индуцированном повреждении миокарда. Изменения свойств АГ могут быть связаны с нормализацией редокс-статуса

в условиях улучшения перфузии миокарда за счёт проявления ДПК антиромботической активности, а также в результате наличия антиоксидантных свойств у данного соединения.

Список литературы/References

1. McGettigan P., Henry D. *PLoS Med*, 2013; 10: 1001388. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001388>
2. Turgut D., Mustafa M., Huseyin F.G., *The American Journal of Emergency Medicine*, 2021; 560: 560-566. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2020.11.022>
3. Hanna V.S., Hafez E.A.A. *J Adv Res*, 2018; 11: 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.03.005>
4. Mitchell J.A., Kirkby N.S. *British Journal of Pharmacology*, 2019; 176: 1038-1050. <https://doi.org/10.1111/bph.14167>
5. Hausenloy D.J., Yellon D.M. *J Clin Invest*, 2013; 123: 92-100. <https://doi.org/10.1172/JCI62874>
6. Tan M., Yin Y., Ma X., Zhang J., Pan W., Tan M., Zhao Y., Yang T., Jiang T., Li H. *Cell Death Dis*, 2023; 14: 131. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05645-y>
7. Won S.J., Kim J.E., Cittolin-Santos G.F., Swanson R.A. *Journal of Neuroscience*, 2015; 35: 7143-7152. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4826-14.2015>
8. Vázquez-Meza H., Vilchis-Landeros M.M., Vázquez-Carrada M., Uribe-Ramírez D., Matuz-Mares D. *Antioxidants*, 2023; 12: 834. <https://doi.org/10.3390/antiox12040834>
9. Matasova L.V., Popova T.N. *Biochemistry (Moscow)*, 2008; 73: 957-964. <https://doi.org/10.1134/S0006297908090010>

Информация об авторах / Information about the authors

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

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

С.А. Олейник – аспирант кафедры медицинской биохимии, молекулярной и клеточной биологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Д.Р. Беспалов – студент кафедры медицинской биохимии, молекулярной и клеточной биологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

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.

10. Kayani K.F., Shatery O.B.A., Mohammed S.J., Ahmed H.R., Hamarawf R.F., Mustafa M.S. *Nanoscale Adv*, 2025; 7: 13-41. <https://doi.org/10.1039/D4NA00652F>

11. Ohsugi T., Ikeda S., Sumi H. *Food Science and Technology Research*, 2005; 11: 308-310. <https://doi.org/10.3136/fstr.11.308>

12. None N.N., Ahmed M.M., *Journal of Contemporary Clinical Practice*, 2025; 11: 286-291. <https://doi.org/10.61336/jccp/25-05-37>

13. Ma N., Yang Y., Liu X., Li S., Qin Z., Li J. *Journal of Proteomics*, 2020; 215: 103631. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103631>

14. Reznick A.Z., Packer L. *Methods Enzymol*, 1994; 233: 357-363. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33041-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33041-7)

15. Mawatari K., Atsumi M., Nakamura F., Yasuda M., Fukuuchi T., Yamaoka N., Kaneko K., Nakagomi K., Oku N., *International Journal of Tryptophan Research*, 2019; 12: 1178646919852120. <https://doi.org/10.1177/1178646919852120>

16. Murakami K., Tanemura Y., Yoshino M. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2003; 14: 99-103. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00252-8](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00252-8)

17. Murakami K., Yoshino M. *Biomedical Research*, 1999; 20: 321-326. <https://doi.org/10.2220/biomedres.20.321>

18. Murakami K., Ueda T., Morikawa R., Ito M., Haneda M., Yoshino M. *Biomedical Research*, 1998; 19: 205-208. <https://doi.org/10.2220/biomedres.19.205>

19. Medvedeva L.V., Popova T.N., Artyukhov V.G., Matasova L.V., Akatova R.V. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2002; 134: 130-134. <https://doi.org/10.1023/A:1021171811902>

Статья поступила в редакцию 10.09.2025; одобрена после рецензирования 17.11.2025; принята к публикации 26.11.2025.

The article was submitted 10.09.2025; approved after reviewing 17.11.2025; accepted for publication 26.11.2025.