



УДК 577.11

Использование ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе для разделения изоферментов малатдегидрогеназы из гепатоцитов крыс в норме и при аллоксановом диабете

© 2021 Селиванова Н.В., Моисеенко А.В., Бакарев М.Ю., Епринцев А.Т.

Воронежский государственный университет, Воронеж

Поступила в редакцию 01.12.2020 г.

DOI: 10.17308/sorpchrom.2021.21/3641

Целью данной работы являлось исследование особенностей функционирования мультифункционального фермента углеводного метаболизма – малатдегидрогеназы (МДГ) у крыс в норме, в условиях аллоксанового диабета и у животных с патологией, принимавших перорально спиртовой экстракт полыни горькой, а также выделение фермента с помощью ионообменной хроматографии. Индукцию экспериментального сахарного диабета осуществляли с помощью однократного внутривентрального введения 5% раствора аллоксана самцам белых лабораторных крыс (*Rattus norvegicus*) линии Wistar. После появления признаков диабета всех крыс разделили на 3 группы: контрольные животные (аллоксан не вводился), группа «диабет» (животные с признаками диабета) и группа «диабет + экстракт полыни (ЭП)» (крысы с повышенным уровнем глюкозы в крови, принимавшие вместо воды спиртовой экстракт полыни).

Сравнение удельной активности МДГ из гепатоцитов печени крыс контрольной группы, подвергнутых аллоксановому диабету, и животных с патологией, принимавших экстракт полыни показывает, что в условиях индуцированного диабета скорость функционирования МДГ увеличивается, тогда как пероральное введение экстракта полыни снижало исследуемый показатель до нормальных значений. Для решения вопроса об активации при аллоксановом диабете тех или иных метаболических процессов, связанных с малатдегидрогеназной активностью проводили ее очистку.

Проведенные исследования показали, что по сравнению с контрольными животными, в гепатоцитах в которых присутствуют две изоформы МДГ2 и МДГ1 с удельной активностью 39.7 Е/мг белка и 48.0 Е/мг белка и степенью очистки 99.2 и 120.0, соответственно, у животных с экспериментальным диабетом появляется дополнительная изоформа МДГ3 с удельной активностью 38 Е/мг белка и степенью очистки 47.5. Для группы крыс, которым вводили перорально экстракт полыни, было характерно наличие двух изоформ МДГ с удельной активностью 72.08 и 60.5 Е/мг белка и степенью очистки 182.0 и 152.2, соответственно, что совпадало с тенденциями, характерными для изоферментов малатдегидрогеназы из контрольной группы животных. Таким образом, использование 4х-стадийной очистки позволило получить высокоочищенные препараты изоформ МДГ из печени крыс в условиях аллоксанового диабета. Увеличение активности и появление новой изоформы МДГ в печени крыс при диабете подтверждают возможность участия малатдегидрогеназной ферментной системы в адаптивной реакции организма при стрессовых условиях. Полученные результаты свидетельствуют, что экстракт полыни обладает гипогликемическим действием, проявляющимся в заметном снижении концентрации глюкозы в крови крыс при аллоксановом диабете, и блокировании образования дополнительной изоформы МДГ у животных с экспериментальным диабетом.

Ключевые слова: малатдегидрогеназа, диабет, изоформы, ионообменная хроматография, электрофорез.

Введение

Свойства и функции, а также особенности строения ферментов можно изу-

чить только при наличии их высокоочищенных препаратов. Получение белка в гомогенном состоянии – сложная задача, так как исследуемые образцы, являющиеся источником фермента, содержат

большое количество разнообразных белков и ферментных комплексов. Помимо этого, трудности выделения чистых энзимов связаны с лабильностью белков и их способностью к денатурации. Доказано, что ионный обмен является одним из основных методов фракционирования лабильных биологических веществ [1]. Несмотря на развитие современных высокоэффективных методов очистки белков, ионообменная хроматография играет все более важную роль в разделении и получении в гомогенном состоянии биомолекул. Обычно изоформы фермента имеют примерно одинаковую молекулярную массу, что делает разделение методом гелевой фильтрации невозможным. Однако небольшие различия величин зарядов, обусловленные изменением аминокислотного состава, позволяют разделять изоферменты с помощью ионообменной хроматографии [2].

Известно, что углеводы являются основным метаболическим топливом, которое служит энергетическим потребностям тканей млекопитающих. В периоды голодания и при диабете глюкоза может вырабатываться по пути глюконеогенеза, который эволюционно сохраняется от микроорганизмов до позвоночных [3, 4]. Он имеет особенно важное значение в печени, которая является главным метаболически активным органом, участвующим в поддержании гомеостаза глюкозы. Активизация глюконеогенеза в печени пациентов с сахарным диабетом 2 типа считается основным фактором, способствующим гипергликемии и последующему диабетическому повреждению органов (в норме глюконеогенетические трансформации в печени млекопитающих протекают с относительно низкой скоростью) [3, 5]. Кроме того, при адаптации клеточного метаболизма к стрессовым факторам окружающей среды организм начинает регулировать скорость функционирования отдельных ферментных систем клетки. Малатдегидрогеназа (МДГ, КФ 1.1.1.37) является ферментом с важными метаболическими функциями.

Она катализирует обратимое превращение малата в оксалоацетат, играет важную роль в цикле лимонной кислоты и рассматривается как маркерный фермент этого цикла. Кроме того, данный энзим непосредственно участвует в метаболизме глюкозы. Митохондриальная активность МДГ указывает на общий метаболический статус. Снижение цитозольной МДГ отражает угнетение энергетического обмена в цитоплазме. Активность малатдегидрогеназы является важным параметром для оценки метаболических условий, как в митохондриях, так и в цитоплазме [6]. Поскольку сахарный диабет приводит к метаболическим нарушениям, можно также ожидать изменения общей активности МДГ и распределения ее изоформ. В связи с этим большой интерес представляет изучение действия экспериментального диабета на структурно-функциональные трансформации малатдегидрогеназы в гепатоцитах крыс. Исходя из этого, целью данной работы явилось исследование особенностей функционирования мультифункционального фермента углеводного метаболизма – малатдегидрогеназы у крыс в норме, в условиях аллоксанового диабета и у животных с патологией, принимавших перорально спиртовой экстракт полыни горькой, а также выделение фермента с помощью ионообменной хроматографии.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования использовали половозрелых самцов белых лабораторных крыс (*Rattus norvegicus* L.) линии Вистар массой 180-200 г в стандартных условиях вивария ВГУ, при температуре $21 \pm 2^\circ\text{C}$ и влажности воздуха $53 \pm 5\%$, с доступом воды и пищи на стандартном рационе. Животные подвергались воздействию дневного цикла 12/12 ч (световая фаза с 9 утра до 9 вечера по московскому времени). Индукцию экспериментального сахарного диабета осуществляли с помощью однократного введения 5%-ного раствора аллоксана

(LaChema, Чехия), предварительно растворенного в 0.9% цитрате натрия. Доза составляла 150 мг на 1 кг живой массы. Инъекции производились внутривенно. Контрольным животным вместо аллоксана вводился раствор 0.9% цитрата натрия. После появления признаков диабета всех крыс разделили на 3 группы: контрольные животные (аллоксан не вводился), группа «диабет» (животные с признаками диабета) и группа «диабет + экстракт полыни (ЭП)» (крысы с повышенным уровнем глюкозы в крови, принимавшие вместо воды спиртовой экстракт полыни). Для получения ткани печени опытных животных подвергали декапитации под эфирным наркозом.

Для приготовления спиртового экстракта полыни (ЭП) использовали следующую методику: 5 г полыни горькой (*Artemisia absinthium* L.) растирали в ступке вместимостью 200 см³. Затем приливали 100 см³ 70% этилового спирта, и 7 суток экстракт вращался на ротаторе. Далее отфильтрованную смесь выпаривали на водяной бане до получения черновато-коричневого концентрата. Приготовленный экстракт добавляли в поилки (0.06 см³ концентрата на 250 см³ воды) в дозе 70 мг/кг массы тела в сутки [7].

Определение глюкозы проводили натощак с помощью глюкометра «Сателлит плюс» (Россия). Кровь для анализа брали из хвостовой вены.

Определение активности малатдегидрогеназы осуществляли на спектрофотометре СФ-2000 (ЛОМО, Россия) по изменению А₃₄₀, путем измерения начальных скоростей восстановления оксалоацетата (окисление НАДН). Пробу смешивали с 3 см³ раствора для СФ (50 мМ трис-НСl буфер, рН 7.5; 1.5 мМ оксалоацетат и 0.15 мМ никотинамидадениндинуклеотидгидрид (НАДН), 5 мМ MgCl₂, 4 мМ дитиотреитол (ДТТ)).

Для получения гомогенных изоформ малатдегидрогеназы использовали разработанную нами четырехстадийную схему очистки, которая включала получение гомогената, высаливание образца с целью

его концентрирования, обессоливание на сефадексе G-25 и, наконец, ионообменную хроматографию. Важнейшим этапом очистки являлось использование ДЭАЭ-целлюлозы в качестве анионообменника [1], благодаря которому нам удалось получить в высокоочищенном состоянии исследуемые изоформы МДГ из печени контрольных крыс, крыс с экспериментальным диабетом и животных с экспериментальным диабетом, получавших спиртовой экстракт полыни горькой. Очищенный от низкомолекулярных примесей на сефадексе G-25 препарат вносили в колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (1.2x13 см). В качестве элюирующего раствора использовали 50 мМ трис-НСl буфер (рН 7.5), содержащий ЭДТА (0.1 мМ) и β-меркапто-этанол (1%). Для удаления белков, не связавшихся с хроматографическим носителем, сорбент промывали 20 мл среды элюции. 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.

Неденатурирующий электрофорез проводили в полиакриламидном геле с Трис-глициновой буферной системой, описанной Дэвисом [8]. Проявление геля на активность малатдегидрогеназы осуществляли с использованием тетразолиевого метода в реакционной смеси следующего состава: 50 мМ Tris-НСl рН=9.0; 2 мМ малат; 3 мМ NAD⁺; 1 мМ ФМС; 1 мМ MgCl₂; НСТ 10 мг на 10 см³.

Опыты проводили в 3-4-кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Предварительная оценка характера распределения проводилась по асимметрии и эксцессу (Excel, Microsoft Office), а также с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Полученные значе-

ния позволили оценить характер распределения как нормальный. Критерий Стьюдента использовался с применением поправки на множественные сравнения (поправка Бонферрони) [9]. Дополнительно применялся однофакторный дисперсионный анализ ANOVA (достоверными считали различия при $p < 0.05$).

Обсуждение результатов

Статистической разницы в уровне глюкозы между исследуемыми группами до введения аллоксана не было ($P=0.13$). Через 72 ч после введения аллоксана у всех обработанных животных был обнаружен повышенный уровень глюкозы (диабет= 19.3 ± 0.67 ммоль/дм³ и диабет+ЭП= 19.7 ± 1.35 ммоль/дм³) (рис. 1). В конце экспериментального периода уровень глюкозы в группе диабет+ЭП был все еще повышен по сравнению с обеими контрольными группами, но достоверно ниже, чем в группе диабет (диабет= 18.9 ± 2.14 ммоль/дм³ и диабет+ЭП= 8.3 ± 3.18 ммоль/дм³). В присутствии внутриклеточных тиолов, особенно глутатиона, аллоксан образует активные формы кислорода (АФК) в циклической окислительно-восстановительной реакции со своим восстановительным продуктом-диалуровой кислотой. При ее автоокислении образуются супероксидные

радикалы, перекись водорода и, на последней стадии реакции, катализируемой железом, гидроксильные радикалы. Эти гидроксильные радикалы, в конечном счете, ответственны за гибель бета-клеток поджелудочной железы, которые обладают особенно низкой антиоксидантной защитной способностью, и последующее состояние инсулинзависимого «аллоксанового диабета» [10].

У группы контрольных здоровых животных уровень сахара в крови колебался в пределах нормы на протяжении всего времени эксперимента и в среднем составлял 4.8 ± 0.12 ммоль/дм³.

Сравнение общей и удельной активности малатдегидрогеназы из гепатоцитов печени крыс контрольной группы, подвергнутых аллоксановому диабету и животных с патологией, принимавших экстракт полыни показано в таблице 1. Данные показывают, что после индукции аллоксанового диабета активность МДГ увеличилась в 1.9 раза по сравнению с контрольной группой. Экстракт полыни, введенный крысам, оказывал нивелирующее действие на изменение ферментативной активности малатдегидрогеназы.

Вероятно, рост активности МДГ является ответом организма на интенсифика-

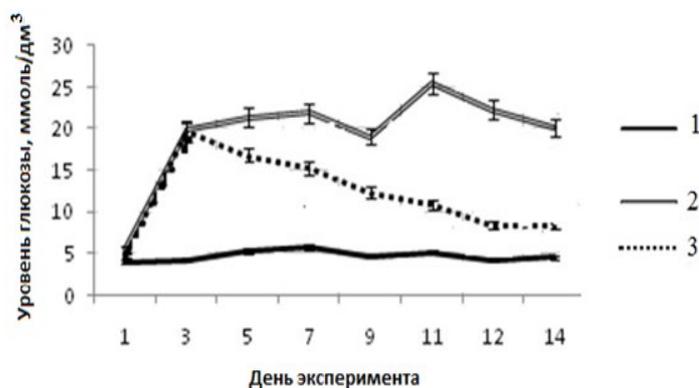


Рис. 1. Динамика изменения уровня глюкозы в крови у крыс контрольной группы (1), крыс, подвергнутых аллоксановому диабету (2) и животных с патологией, принимавших экстракт полыни (3)

Fig. 1. Dynamics of changes in glucose levels in blood of rats from the control group (1), rats exposed to alloxan-induced diabetes (2), and animals with a pathology which were given the wormwood extract (3)

Таблица 1. Активность малатдегидрогеназы в гомогенате печени крыс контрольной группы (норма), крыс, подвергнутых аллоксановому диабету (диабет) и животных с патологией, принимавших экстракт полыни (диабет + ЭП), (n=3, p<0.05).

Table 1. Malate dehydrogenase activity in the liver homogenate of rats from the control group (norm), rats, exposed to alloxan-induced diabetes (diabetes) and animals with a pathology which were given the wormwood extract (diabetes + AE), (n=3, p<0.05).

Условия опыта	Общая активность, Е/г.с.м.	Удельная активность, Е/мг белка
Норма	0.27 ± 0.01	0.55 ± 0.03
Диабет	0.66 ± 0.01	1.22 ± 0.02
Диабет + ЭП	0.30 ± 0.01	0.50 ± 0.02

Таблица 2. Стадии очистки малатдегидрогеназы из гепатоцитов контрольных крыс, (n=3; p≤0.05).

Table 2. Stages of the malate dehydrogenase purification from hepatocytes of control rats, (n=3, p≤0.05).

Стадия	Общий объём, см ³	Общая активность, Е	Белок, Мг	Удельная активность, ФЕ/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	4.8	60.8	152	0.4	100	1
Высаливание (35%-80%)	2.5	28	21.5	1.3	47	3.25
Гель-фильтрация через сефадекс G-25	6	24	13	1.8	39	4.5
Хроматография на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой	2	7.1	0.18	39.7	12	99.2
	2	14.4	0.3	48	23	120

Таблица 3. Этапы очистки малатдегидрогеназы гепатоцитов крыс с индукцией аллоксанового диабета, (n=3; p≤0.05).

Table 3. Stages of purification of malate dehydrogenase in the hepatocytes of rats with alloxan-induced diabetes (n=3; p≤0.05).

Стадия	Общий объём, см ³	Общая активность, Е	Белок, Мг	Удельная активность, ФЕ/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	5	123	157.2	0.8	100	1
Высаливание (35%-80%)	2	56.7	17.1	3.3	46	4.1
Гель-фильтрация через сефадекс G-25	6	43	1.6	26.8	34.9	33.3
Хроматография на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой	2	24.3	0.3	81	19.7	101.2
	2	16.1	0.18	89.4	13	111.7
	2	4.2	0.11	38	3.4	47.5

цию аллоксанового диабета в гепатоцитах при развитии патологии. Малатдегидрогеназный комплекс обеспечивает перенос восстановительных эквивалентов между цитоплазмой, митохондриями и

микротельцами [11], функционирование клеточного дыхания [12], участвует в глюконеогенезе при мобилизации запасных жиров и является ферментом глиок-

Таблица 4. Этапы очистки малатдегидрогеназы гепатоцитов крыс с индукцией аллоксанового диабета, получавших экстракт полыни (n=3; p≤0.05).

Table 4. Stages of purification of malate dehydrogenase in the hepatocytes of rats with alloxan-induced diabetes which were treated with the wormwood extract (n=3; p≤0.05)

Стадия	Общий объём, см ³	Общая активность, Е	Белок, Мг	Удельная активность, ФЕ/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	5	62.5	153.1	0.4	100	1
Высаливание (35%-80%)	2	27.1	19.3	1.4	43	3.5
Гель-фильтрация через сефадекс G-25	6	24.7	1.1	22.4	39.5	56
Хроматография на колонке с ДЭАЭ целлюлозой	2	10.2	0.14	72.8	16	182
	2	12.1	0.2	60.5	19	152.2

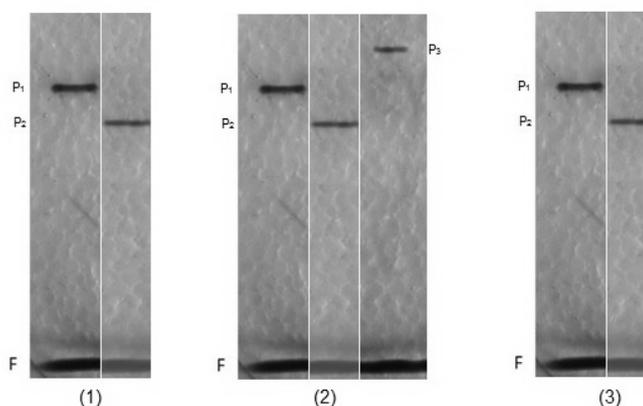


Рис. 2. Электрофореграммы специфического проявления малатдегидрогеназы очищенных препаратов из печени крысы в норме (1), в условиях аллоксанового диабета (2) и животных с патологией, принимавших экстракт полыни(3); P₁, P₂, P₃, – изоформы малатдегидрогеназы, с R_f0.26, 0.24 и 0.18, соответственно;F – фронт маркера-красителя бромфенолового синего.

Fig. 2. Electropherograms of the specific development of malate dehydrogenase of purified preparations from the livers of normal rats (1), rats with alloxan-induced diabetes (2) and animals with a pathology which were given the wormwood extract (3); P₁, P₂, P₃ - isoforms of malate dehydrogenase, with R_f0.26, 0.24, and 0.18, respectively; F – marker front of the bromophenol blue dye.

силатного цикла [13]. Наблюдаемое увеличение активности исследуемого энзима может быть связано как со сменой использования глюкозы (как главного источника энергии) на жирные кислоты и кетоновые тела, интенсивно мобилизующиеся из триацилглицеролов жировой ткани организма крыс при диабете, так и с активацией митохондриальных окислительных процессов для энергообеспечения клеток в стрессовых условиях.

Использование ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе в качестве итогового этапа очистки позволило нам получить исследуемые изоформы малатдегидрогеназы в высокоочищенном состоянии. Показано, что по сравнению с контрольными животными, в гепатоцитах которых присутствуют две изоформы МДГ2 и МДГ1 с удельной активностью 39.7 Е/мг белка и 48.0 Е/мг белка и степенью очистки 99.2 и 120.0, соответ-

ственно, (табл. 2) у животных с экспериментальным диабетом появляется дополнительная изоформа МДГ3 с удельной активностью 38 Е/мг белка и степенью очистки 47.5 (табл. 3). Ранее было выявлено, что при индукции сахарного диабета у крыс наблюдается появление дополнительной формы аконитгидратазы [14]. Для группы крыс, которым вводили перорально экстракт полыни, было характерно наличие двух изоформ МДГ с удельной активностью 72.08 и 60.5 Е/мг белка и степенью очистки 182.0 и 152.2, соответственно, (табл. 4) что совпадало с тенденциями, характерными для изоферментов малатдегидрогеназы из контрольной группы животных.

Полученные после проведенной многоступенчатой очистки фракции, исследовали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с последующим проявлением на малатдегидрогеназную активность тетразолиевым методом (малат являлся субстратом реакции). На рис. 2 видно, что все исследуемые пробы проявляют малатдегидрогеназную активность, т.к. на всех типичных электрофореграммах четко видны синие полосы – продукты восстановления нитросинего тетразолия.

Заключение

Таким образом, использование анионообменника (ДЭАЭ-целлюлозы) в качестве конечного этапа разработанной нами

Список литературы

1. Селеменев В.Ф., Хохлов В.Ю., Бобришова О.В., Аристов И.В. и др. Физико-химические основы сорбционных и мембранных методов выделения и разделения аминокислот. М. Стелайт. 2002. 299 с.
2. Селиванова Н.В., Магулян М.Б., Моисеенко А.В., Епринцев А.Т. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2020. Т. 20. № 1. С. 95-99.
3. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Шевченко М.Ю. Глиоксилатный цикл: универсальный механизм адаптации? М. ИКЦ «Академкнига». 2007. 228 с.

многоступенчатой схемы очистки, позволило выделить изоферменты малатдегидрогеназы из печени здоровых крыс и животных с патологией в гомогенном состоянии. Выявленное увеличение активности МДГ в печени крыс при диабете связано с появлением новой изоформы исследуемого энзима и может быть рассмотрено, как причастность малатдегидрогеназной ферментной системы к адаптации крыс к аллоксановому диабету. Мы предполагаем, что активация МДГ связана с интенсификацией глюконеогенетических и дыхательных процессов, так как ранее этот факт был подтвержден при исследовании других ферментных систем [5]. Кроме того, появление дополнительной изоформы МДГ свидетельствует, по видимому, об индукции дополнительного метаболического пути (глиоксилатного цикла) у крыс в условиях экспериментального диабета. Известно, что при диабете в пероксисомах наблюдается повышенное поступление жирных кислот и развивается окислительный стресс [15], что согласуется с нашими результатами. Полученные нами данные свидетельствуют, что экстракт полыни обладает гипогликемическим действием, проявляющимся в заметном снижении концентрации глюкозы в крови крыс при аллоксановом диабете, и блокирует образование дополнительной изоформы МДГ у животных с экспериментальным диабетом.

4. Григорьева Е.А., Неёлова О.В. // *Современные наукоемкие технологии*. 2014. № 7-2. С. 85-85.
5. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Шевченко М.Ю. Экспрессия и регуляция ферментов глиоксилатного цикла. Воронеж. Центрально-Черноземное книжное изд-во. 2005. 224 с.
6. Епринцев А.Т., Фалалеева М.И., Климова М.А., Компанцева Е.И. // *Биохимия*. 2006. Т. 71. Вып. 6. С. 856-860.
7. Yazdi H.B., Hojati V., Shiravi A., Hosseinian S. et al. // *J Pharmacopuncture*. 2019. Vol. 22. No 2. pp. 109-114.
8. Williams D.E., Reisfeld R.A. // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1964. Vol.

121. No 2. pp. 372-381.
9. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М. Практика. 1999. 459 с.
10. Lenzen S. // *Diabetologia*. 2008. Vol. 51. No 2. pp. 216-226.
11. Игамбердиев А.У. Логика организации живых систем. Воронеж. ВГУ. 1995. С. 30-112.
12. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. М. Мир. 1988. С. 311-337.
13. Popov V.N., Volvenkin S.V., Eprintsev A.T., Igamberdiev A.U. // *FEBS Lett*. 1998. Vol. 440. No 1-2. pp. 55-58.
14. Аль Дайни Саба Хади, Сыромятников М.Ю., Гати Моханнад Абдулраззак Гати, Епринцев А.Т. // *Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2012. № 1. С. 176-180.
15. Tureck L., Kupov V., Uhlkov E., Mojto V. // *Physiol Res*. 2014. Vol. 63(Suppl 4). pp. 585-591.

The use of ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose for the separation of isoenzymes of malate dehydrogenase from hepatocytes of normal rats and rats with alloxan-induced diabetes

© 2021 Selivanova N.V., Moiseenko A.V., Bakarev M.Yu., Eprintsev A.T.

Voronezh State University, Voronezh

The aim of this work is to study the functional features of the multifunctional enzyme of the carbohydrate metabolism, malate dehydrogenase (MDH), in normal rats, rats with alloxan-induced diabetes, and in animals with a pathology which were orally given the alcohol extract of wormwood. It also investigated the isolation of the enzyme using ion exchange chromatography. The induction of experimental diabetes was carried out by a single intraperitoneal injection of 5% alloxan solution to Wistar white male laboratory rats (*Rattus norvegicus*). After the signs of diabetes appeared, all rats were divided into 3 groups: control animals (no injections of alloxan), the “diabetes” group (animals with signs of diabetes), and the “diabetes + wormwood extract (WE)” group (rats with increased glucose levels in blood that were given alcohol extract of wormwood instead of water).

The comparison of the specific activity of MDH from hepatocytes of livers of the rats from the control group subjected to alloxan diabetes and animals with a pathology which were given the wormwood extract, showed that under the conditions of induced diabetes, the rate of MDH functioning increases, while oral administration of the wormwood extract reduced the studied parameter to normal values. A purification of malate dehydrogenase was carried out to resolve the issue regarding the activation of certain metabolic processes associated with malate dehydrogenase activity in case of alloxan-induced diabetes.

The study showed that in comparison with the control animals, whose hepatocytes contained two MDH2 and MDH1 isoforms with a specific activity of 39.7 U/mg protein and 48.0 U/mg protein and the purification degree of 99.2 and 120.0, respectively, the animals with experimental diabetes also had an additional isoform of MDG3 with a specific activity of 38 U/mg protein and the degree of purification of 47.5. Two MDH isoforms with a specific activity of 72.08 and 60.5 U/mg protein and the degree of purification of 182.0 and 152.2, respectively, were characteristic of the group of rats that were orally administered a wormwood extract, which was consistent with the trends characteristic of malate dehydrogenase isoenzymes from the control group of animals. Thus, the use of 4-stage purification made it possible to obtain highly purified preparations of MDH isoforms from rat liver with alloxan-induced diabetes. The increase in activity and the appearance of a new isoform of MDH in the liver of diabetic rats confirm the possibility of the participation of the malate dehydrogenase enzyme system in the adaptive response of the organism under stress conditions. The results of the study indicate that a wormwood extract has a hypoglycemic effect, which is manifested in a noticeable decrease in the concentration of glucose in the blood of rats with alloxan-induced diabetes and in blocking the formation of an additional MDH isoform in animals with experimental diabetes.

Keywords: malate dehydrogenase, diabetes, isoforms, ion exchange chromatography, electrophoresis.

References

1. Selemenev V.F., Khohlov V.Ju., Bobreshova O.V., Aristov I.V. et al. *Fiziko-himicheskie osnovy sorbcionnyh i membrannyh metodov vydeleniya i razdeleniya aminokislot* M., Stelajt, 2002. 299 s.
2. Selivanova N.V., Maguljan M.B., Moiseenko A.V., Eprincev A.T., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2020, Vol. 20, No 1, pp. 95-99.

3. Eprincev A.T., Popov V.N., Shevchenko M.Yu., Glioksilatnyj cikl: universal'nyj mehanizm adaptacii?, M., IKC «Akademkniga», 2007, 228 p.
4. Grigor'eva E.A., Nejolova O.V., *Sovremennye naukoemkie tehnologii*, 2014, No 7-2, pp. 85-85.
5. Eprincev A.T., Popov V.N., Shevchenko M.Yu., Jekspressija i reguljacija fermentov glioksilatnogo cikla, Voronezh, Central'no-Chernozemnoe knizhnoe izd-vo, 2005, 224 p.
6. Eprincev A.T., Falaleeva M.I., Klimova M.A., Kompanceva E.I., *Biokhimija*, 2006, Vol. 71, No 6, pp. 856860.
7. Yazdi H.B., Hojati V., Shiravi A., Hosseinian S. et al., *JPharmacopuncture*, 2019, Vol. 22, No 2, pp. 109-114.
8. Williams D.E., Reisfeld R.A., *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1964, Vol. 121, No 2, pp. 372-381.
9. Glanc S., *Mediko-biologicheskaya statistika*, M., Praktika, 1999, 459 p.
10. Lenzen S., *Diabetologia*, 2008, Vol. 51, No 2, pp. 216-226.
11. Igamberdiev A.U., *Logika organizacii zhivyh system*, Voronezh, VGU, 1995, pp. 30-112.
12. Hochachka P., Somero Dzh., *Biohimicheskaja adaptacija*, M., Mir, 1988, pp. 311-337.
13. Popov V.N., Volvenkin S.V., Eprintsev A.T., Igamberdiev A.U., *FEBS Lett.*, 1998, Vol. 440, No 1-2, pp. 55-58.
14. Al' Dajni Saba Hadi, Syromjatnikov M. Ju., Gati Mohannad Abdulrazzak Gati, Eprincev A.T., *Vestnik VGU, Serija: Khimija. Biologija. Farmacija*, 2012, No 1, pp. 176-180.
15. Tureck L., Kupov V., Uhlkov E., Mojto V., *Physiol Res*, 2014, 63(Suppl 4), pp. 585-591.

Селиванова Наталия Владимировна – к.б.н., доцент кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

Моисеенко Александр Владимирович – инженер кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

Бакарев Максим Юрьевич – старший лаборант кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

Епринцев Александр Трофимович – д.б.н., проф., зав. кафедрой биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

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

Moiseenko Alexandr V. – engineer of Department of Biochemistry and Physiology, Voronezh State University, Voronezh, E-mail: moisah@mail.ru

Bakarev Maxim Yu. – Senior Laboratory Assistant of Department of Biochemistry and Physiology, Voronezh State University, Voronezh, E-mail: max15111@mail.ru

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