



УДК 577.151.6:616.4

Применение хроматографических методов для очистки глутатионредуктазы из печени крыс с экспериментальным сахарным диабетом 2 типа

©2021 Агарков А.А., Попова Т.Н., Чичай А.С., Михалева О.С., Попова С.Е.

Воронежский государственный университет, Воронеж

Поступила в редакцию 01.06.2021 г.

DOI: 10.17308/sorpchrom.2021.21/3784

Целью настоящей работы явилось определение активности глутатионредуктазы (ГР, КФ 1.6.4.2) из печени крыс с экспериментальным сахарным диабетом 2 типа СД2 и животных, которым на фоне патологии вводили 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфониума (SkQ1), а также разработка схемы очистки фермента с применением хроматографических методов. В эксперименте использовали печень крыс контрольной группы животных, со стрептозотоциновым СД2 и крыс с экспериментальной гипергликемией, которым вводили SkQ1. СД2 индуцировали путем комбинации высокожировой диеты в течение 1 месяца и последующего двукратного внутривнутрибрюшинного введения стрептозотоцина с интервалом 7 дней в дозе 30 мг/кг веса животного в цитратном буфере pH 4.4. SkQ1 вводили в виде раствора в дозе 1250 нмоль/кг/сут со второй недели эксперимента утром 1 раз в день. Активность ГР определяли спектрофотометрически на СФ-56 при 340 нм. Общее количество белка определяли по методу Лоури. Выявлено возрастание активности ГР в печени крыс со стрептозотоциновым СД2 относительно значений контрольной группы животных, а также установлено, что введение SkQ1 животным с патологией приводило к уменьшению активности исследуемого фермента. С помощью метода разделения белков сульфатом аммония, а также гель-фильтрации через сефадекс G-25 и ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе получены ферментные препараты ГР, очищенные в 56.5, 45.57 и 52.9 раз из печени крыс контрольной группы, животных с СД2, индуцированным стрептозотоцином, и крыс с экспериментальной гипергликемией, которым вводили SkQ1. Выявлено, что в ходе использования ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе десорбция основного пула фермента, выделенного из печени контрольных животных, наблюдалась при использовании KCl в концентрации 100 ммоль/дм³, в ходе очистки фермента из печени животных с экспериментальной гипергликемией – 50 ммоль/дм³. При использовании SkQ1 в качестве протектора на фоне патологии часть ГР, десорбирующейся с ДЭАЭ-целлюлозы при использовании KCl в концентрации 100 ммоль/дм³, увеличивалась по сравнению с патологией. Вероятно, это может быть связано с изменением общего заряда молекулы исследуемого фермента в условиях оксидативного стресса, возникающего при гипергликемии.

Ключевые слова: ионообменная хроматография, глутатионредуктаза, сахарный диабет 2 типа, свободнорадикальное окисление, SkQ1.

Введение

В настоящее время существует значительное количество данных, свидетельствующих об участии свободнорадикальных процессов в развитии сахарного диабета 2 типа (СД2) и сопутствующих осложнений [1-4].

Активации процессов генерирования свободных радикалов (СР) способствует

повышенное содержание глюкозы в крови посредством активации альтернативных путей ее окисления [5]. Последствием гипергликемии также является продукция супероксида митохондриальными клетками, цитохромом P-450, ксантиноксидазой [6]. Возникающий, таким образом, окислительный стресс приводит к разобщению инсулиновой сигнализации [7], гиперпродукции глюкозы клетками печени [8]. При этом повы-

шенный уровень свободных жирных кислот (СЖК) в крови приводит к усилению образования активных форм кислорода (АФК) [9]. Избыточно образующиеся АФК окисляют биомембраны, в результате чего формируются метаболические нарушения и повреждения клеток и тканей организма. Проявлению повреждающего действия, опосредованного СР, препятствует поликомпонентная антиоксидатная система (АОС), обеспечивающая нейтрализацию радикалов [10].

Одним из важнейших компонентов антиоксидатной защиты является глутатионовая антиоксидатная система. Восстановленный глутатион (GSH) является ключевой молекулой окислительно-восстановительных реакций, связанных с тиол-дисульфидным обменом. Окисленная форма глутатиона (GSSG) может быть преобразована обратно в восстановленную форму GSH глутатионредуктазой (ГР) за счет НАДФН [10]. В условиях гиперпродукции АФК глутатионовая антиоксидантная система может быть перегружена. В этой связи поиск экзогенных антиоксидантов, снижающих повреждающее действие СР, является актуальным [4]. SkQ1 относится к митохондриально-направленным антиоксидантам, демонстрирующим эффективность при коррекции ряда патологических состояний у лабораторных животных [11-15].

В настоящее время, наиболее важным и самым распространенным методом выделения и анализа ферментов является хроматография. Белки обычно избирательно адсорбируются на твердых фазах самых различных типов. Поэтому адсорбционные методы, особенно колончатая хроматография, широко используются для разделения белков. Применение этих методов позволяет получить наибольшую степень их очистки. Ионообменная хроматография (ИОХ) представляет собой метод, позволяющий разделять ионы и полярные молекулы на основе их заряда. Она может быть использована для разделения практически

любых заряженных молекул, в том числе ферментов. Целью настоящей работы явилось определение активности ГР, а также разработка схемы очистки фермента из печени крыс с экспериментальным СД2 и животных, которым на фоне патологии вводили SkQ1, с применением хроматографических методов, включающих ИОХ.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования были взяты самцы белых лабораторных крыс массой 200-250 г., содержащиеся на стандартном режиме вивария. Все процедуры, проводимые во время эксперимента, соответствовали требованиям международных правил гуманного отношения к животным, отраженных в санитарных правилах по отбору и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) (УК РФ ст. 245).

Эксперимент проведен на животных, разделенных на три группы: 1-я группа – крысы, содержащиеся на стандартном режиме вивария; 2-я группа – крысы с СД2; 3-я – животные с СД2, которым внутрибрюшинно вводили SkQ1 в виде раствора в дозе 1250 нмоль/кг/сут со второй недели эксперимента утром 1 раз в день. СД2 индуцировали путем комбинации высокожировой диеты в течение 1 месяца и последующего двукратного внутрибрюшинного введения стрептозотоцина (СТЗ) с интервалом 7 дней в дозе 30 мг/кг веса животного в цитратном буфере рН 4.4 [16]. Через две недели после начала моделирования гипергликемии у наркотизированных животных извлекали печень, которая, после многократного перфузирования ледяным физиологическим раствором, была использована для дальнейших исследований.

Для получения тканевого гомогената навеску печени измельчали с помощью гомогенизатора HG-15A-Set в 4-х-кратном объеме охлажденной среды выделения. Среда выделения имела следующий состав: 0.1 моль/дм³ трис-НСl-буфер (рН 7.8), содержащий 1 мМ ЭДТА и 1% β-

меркаптоэтанола. Полученный гомогенат центрифугировали при 3000 g в течение 15 минут для отделения неразрушенных тканевых элементов и ядер. Супернатант использовали для определения исследуемых параметров.

Активность фермента определяли спектрофотометрически на СФ-56 при 340 нм [17] в среде, содержащей 50 мМ калий-фосфатный буфер (рН=7.4), 1 мМ ЭДТА, 0.80 мМ глутатион окисленный, 0.16 мМ НАДФН. Реакцию начинали добавлением ферментного препарата. Единицу ферментативной активности (Е) определяли как количество фермента, которое катализирует превращение одного микромоля субстрата в минуту при температуре +25°C.

Очистку ГР осуществляли в несколько стадий при помощи фракционирования белковой смеси сульфатом аммония с последующим обессоливанием на сефадексе G-25 и ионообменной хроматографии через ДЭАЭ-целлюлозу.

1. Разделение белков сульфатом аммония. Полученная после гомогенизации и центрифугирования смесь белков была использована для фракционирования сульфатом аммония. Для высаливания ГР из раствора белков проводилось постепенное увеличение концентрации сульфата аммония в гомогенате печени. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ постепенно добавляли в гомогенат до получения концентрации, соответствующей нижней границе насыщения (40%). Затем полученный раствор центрифугировали в течение 10 минут при 13000 g. После центрифугирования отбирали надосадочную жидкость добавляли кристаллический сульфат аммония в количестве, соответствующем верхнему пределу насыщения (70%). Затем повторно центрифугировали при 15000 g в течение 15 мин. В результате был получен осадок, содержащий ГР, который ресуспендировали в 4 см³ среды выделения.

2. Обессоливание на сефадексе G-25. Освобождение ферментного препарата от низкомолекулярных примесей осу-

ществляли с помощью гель-фильтрации через колонку с сефадексом G-25 (1.5×20 см) [18]. В качестве элюирующей среды использовали 0.01 М трис-НСl-буфер (рН=7.6), содержащий 0.1 ммоль/дм³ ЭДТА и 1% β-меркаптоэтанола. Количество нанесенного на колонку образца составляло не более 20-25% от ее объема. Скорость элюции составляла

20-25 см³/час. В получаемых фракциях объемом 2-3 см³ спектрофотометрически определяли ферментативную активность. Фракции, обладающие максимальной ферментативной активностью, объединяли и использовали для дальнейшей очистки. Эффективность обессоливания раствора фермента проверяли качественной реакцией с реактивом Несслера, образующим с ионами аммония характерный красно-бурый осадок [19]. Фракции, в которых активность ГР была максимальной, не содержали $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

3. Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. Обессоленную объединенную пробу ферментного препарата наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (1.2×13 см), после чего колонку промывали элюирующей средой для удаления несвязанных белков. Для очистки ГР использовали ступенчатый градиент концентраций КСl в элюирующем буфере. Элюирующая среда имела тот же состав, что и на предыдущей стадии очистки. Фермент десорбировался с колонки в ступенчатом градиенте КСl 50-100 ммоль/дм³. Скорость элюции составляла 30-40 см³/ч. Каждая фракция элюата в количестве 1.5-2.0 см³ была проанализирована на наличие ферментативной активности ГР. Все этапы выделения и очистки фермента осуществляли при температуре 0-4°C.

Общее количество белка определяли методом Лоури [20]. Опыты проводились в 3-4х кратной биологической повторности, аналитические определения для каждой пробы – в двух повторностях. Данные обрабатывали с использо-

ванием стандартных статистических методов [21].

Обсуждение результатов

Результаты исследований показали, что у крыс с СД2 происходит возрастание активности ГР, выраженной в Е/г сырой массы ткани и в Е/мг белка в 2.4 и 1.6 раза относительно контрольной группы животных (табл. 1). Очевидно, интенсификация функционирования ГР происходила в ответ на развитие окислительного стресса (ОС), вызванного продолжительной гипергликемией. При этом наблюдалось снижение активности исследуемого фермента при введении SkQ1 крысам с патологией. Общая активность фермента, выраженная в Е/г

сырой массы, печени снижалась в 2.5 раза, а удельная активность ГР, выраженная в Е/мг белка, в 1.3 раза (табл. 1). Изменение активности ГР в сторону контрольных значений, вероятно, может быть связано с реализацией антиоксидантных свойств SkQ1, снижающих нагрузку на антиоксидантную систему организма.

С помощью методов очистки ГР, описанных выше, были получены ферментные препараты ГР с удельной активностью 3.84, 5.97 и 4.55 Е/мг белка из печени крыс контрольной группы, животных с экспериментальным СД2 и группы животных с СД2, которым вводили SkQ1, соответственно. В ходе исследования было установлено, что в процессе ионообменной хроматографии на колон-

Таблица 1. Очистка глутатионредуктазы из печени крыс контрольной группы, животных сахарным диабетом 2 типа и крыс с патологией, которым вводили SkQ1*

Table 1. Purification of glutathione reductase from the liver of rats in the control group, rats with type 2 diabetes, and rats with a pathology dosed with SkQ1*

Стадия очистки	Условия эксперимента	Количество белка, мг	Общая активность, Е/г сырой массы	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	норма	243.21±11.34	16.54±0.62	0.068±0.002	100	1
	СД2	239.00±9.81	31.31±1.36	0.131±0.005	100	1
	СД2+SkQ1	246.61±7.24	21.21±0.96	0.086±0.003	100	1
Фракционирование сульфатом аммония	норма	198.15±6.42	15.92±0.59	0.080±0.002	96.3±3.12	1.18±0.039
	СД2	151.67±7.58	26.11±1.11	0.172±0.006	83.4±3.26	1.31±0.055
	СД2+SkQ1	183.48±5.95	17.62±0.58	0.096±0.003	83.1±3.29	1.12±0.036
Обессоливание на сефадексе G-25	норма	115.05±3.22	14.94±0.44	0.130±0.004	90.3±4.12	1.91±0.065
	СД2	106.89±2.91	19.64±0.51	0.184±0.007	62.7±2.74	1.40±0.061
	СД2+SkQ1	10.47±0.39	1.16±0.02	0.111±0.003	5.5±1.17	1.29±0.034
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	норма	1.98±0.06	7.60±0.24	3.839±0.121	46.0±1.29	56.45±1.824
	СД2	3.11±0.09	18.57±0.73	5.969±0.214	59.3±2.74	45.57±1.975
	СД2+SkQ1	1.27±0.02	5.79±0.18	4.549±0.195	27.3±1.16	52.89±1.644

*Примечание: в таблице обсуждаются статистически достоверные различия при P<0.05.

*Note: the table presents statistically reliable differences at P<0.05.

ке с ДЭАЭ-целлюлозой ГР из печени крыс контрольной группы десорбировалась с максимальной ферментативной активностью при концентрации KCl 100 мМ (рис. 1).

Для десорбции ГР печени группы крыс с СД2 (рис. 2) и группы животных с СД2 при введении SkQ1 (рис. 3) с колонки наиболее эффективной оказалась концентрация KCl в среде элюции 50 мМ. Белки имеют многочисленные функциональные группы, которые могут иметь положительные или отрицательные заряды. Во время ионообменной хроматографии белки разделяются в соответствии с их зарядом.

Известно, что при окислительном

стрессе, происходит накопление окисленного глутатиона (GSSG) [22]. Кроме того, накопление в клетке соединений, способных окислять SH-групп белков и ферментов, одним из которых, является окисленный глутатион (GSSG), может способствовать изменению их свойств. Так, показано, что инкубация альдоредуктазы из эритроцитов человека в системе с GSSG приводит к увеличению ее удельной активности и изменению хроматографических свойств при ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе: наблюдается более ранний пик активности фермента при элюции [23].

ГР в ходе акта катализа присоединяет

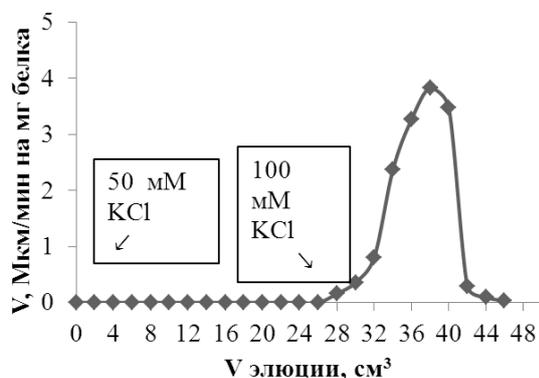


Рис. 1. Элюция глутатионредуктазы из печени крыс контрольной группы при проведении ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе

Fig. 1. Elution of glutathione reductase from the livers of rats in the control group during the ion exchange chromatography on DEAE-cellulose

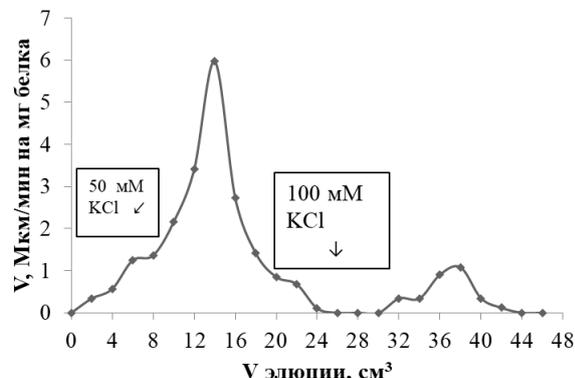


Рис. 2. Элюция глутатионредуктазы из печени крыс с стрептозотоциновым СД2 при проведении ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе

Fig. 2. Elution of glutathione reductase from the livers of rats with streptozotocin-induced 2D during the ion exchange chromatography on DEAE-cellulose

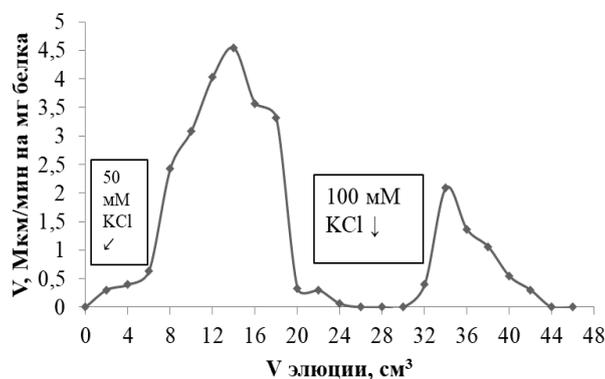


Рис. 3. Элюция глутатионредуктазы из печени крыс с индуцированным СД2 на фоне введения SkQ1

Fig. 3. Elution of glutathione reductase from the livers of rats with induced 2D after injection with SkQ1

NADPH и протон, находясь в окисленном состоянии, и переходит в восстановленную форму EH. При этом разрывается дисульфидная связь между Cys-58 и Cys-63, а имидазольное кольцо His-467' становится положительно заряженным [24]. В этой связи, при повышенной концентрации GSSG в условиях формирующегося окислительного стресса при СД2, количество молекул ГР, у которых имидазольное кольцо His-467' становится положительно заряженным может возрасти, что, вероятно способствовало десорбции большего количества молекул исследуемого фермента с анионообменника - ДЭАЭ-целлюлозы при градиенте концентрации KCl, равной 50 ммоль/дм³ (рис. 2).

Введение животным с экспериментальной гипергликемией протектора (SkQ1), снижающего уровень свободно-радикального окисления [25], по-видимому, способствовало уменьшению концентрации окисленного глутатиона. При использовании ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе для очистки ГР из печени данной группы животных, наблюдался более выраженный пик активности фермента при использовании градиента концентрации KCl 100 ммоль/дм³ (рис. 3).

Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе с использованием среды элюции, содержащей 50мМ и 100мМ KCl позволила повысить степень очистки исследуемого фермента: в 29.6 раза для ГР из печени крыс контрольной группы, в 32.6 раза для ГР из печени животных с индуцированным СД2 и в 41 раз для ГР из печени крыс СД2, которым

вводили SkQ1. Выход при этом составил 46.0, 59.3 и 27.3 соответственно.

Заключение

Таким образом, с помощью комбинирования различных методов очистки, были получены ферментные препараты ГР из печени крыс контрольной группы, а также животных с экспериментальной гипергликемией и крыс, которые получали инъекции SkQ1 при патологии со степенью очистки 56.45, 45.57 и 52.89 раза соответственно. Установлено, что при индуцированной стрептозотоцином гипергликемии происходит увеличение удельной активности фермента в исследуемой ткани. Введение животным с патологией митохондриально направленного антиоксиданта - SkQ1, сопровождается снижением возросшей активности ГР. Выявлено, что в ходе использования ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе десорбция основного пула фермента, выделенного из печени контрольных животных, наблюдалась при использовании KCl в концентрации 100 ммоль/дм³, в ходе очистки фермента из печени животных с экспериментальной гипергликемией – 50 ммоль/дм³. При использовании SkQ1 в качестве протектора на фоне патологии часть ГР, десорбирующейся с ДЭАЭ-целлюлозы при использовании KCl в концентрации 100 ммоль/дм³, увеличивалась по сравнению с патологией. Вероятно, это может быть связано с изменением общего заряда молекулы исследуемого фермента в условиях оксидативного стресса, возникающего при гипергликемии.

4. Verma S., Sagar N., Vats P. // *Int J Bioassays*. 2013. Vol. 2. pp. 685-690.

5. Занозина О.В., Боровков Н.Н., Щербатюк Т.Г. // *Современные технологии в медицине*. 2010. № 3. С. 104-112.

6. Inoguchi T., Li P., Umeda F., Yu H., Kakimoto M. et al. // *Diabetes*. 2000. Vol. 49. pp. 1939-1945.

7. Ткачук В.А., Воротников А.В. // *Сахарный диабет*. 2014. Т. 17. № 3. С. 29-40.

Список литературы

1. Ghasemi-Dehnoo M., Amini-Khoei H., Lorigooini Z., Rafieian-Kopaei M. // *Asian Pac J Trop Med*. 2020. Vol. 13. pp. 431-438.

2. Chandra K., Singh P., Dwivedi S., Jain S. // *Journal of clinical and diagnostic research*. 2019. Vol. 13. pp. BE07-BE12

3. Chikezie P.C., Ojiako O.A., Agomuo C. // *International Journal of Biological Chemistry*. 2015. Vol. 9. pp. 71-79.

8. Пашенцева А.В., Вербовой А.Ф., Шаронова Л.А. // *Ожирение и метаболизм*. 2017. Т. 14. № 2. С. 9-17.
9. Мишина Е.Е., Майоров А.Ю., Богомолов П.О., Мациевич М.В. и др. // *Сахарный диабет*. 2017. №5. С. 335-342.
10. Tiwari V.K., Pandey K.B., Abidi A.B., Rizvi S.I. // *J Biomark*. 2013. Vol. 2013. pp. 1-8.
11. Ловать М.Л., Аврущенко М.Ш., Аверина О.А., Павшинцев В.В. // *Общая реаниматология*. 2016. Т. 12. № 2. С. 6-18.
12. Roginsky V.A., Tashlitsky V.N., Skulachev V.P. // *Aging*. 2009. Vol. 1. pp. 481-489.
13. Юрова М.Н., Забежинский М.А., Пискунова Т.С., Тындык М.Л. и др. // *Успехи геронтологии*. 2010. Т. 23. № 3. С. 430-441.
14. Зиновкин Р.А., Попова Е.Н., Плетьюшкина О.Ю., Ильинская О.П. и др. // *Общая реаниматология*. 2018. № 2. С. 69-86.
15. Agarkov A.A., Popova T.N., Boltysheva Y.G. // *World J Diabetes*. 2019. Vol. 10. No 12. pp. 546-559.
16. Zhang M., Lv X.Y., Li J., Xu Z.G. et al. // *Journal of Diabetes Research*. 2008. Vol. 2008. pp. 1-9.
17. Агарков А.А., Семенихина А.В., Рахманова Т.И., Попова Т.Н. и др. // *Вестник ВГУ, серия: химия, биология, фармация*. 2007. №2. С. 59-63.
18. Селеменов В.Ф., Рудаков О.Б., Славинская Г.В., Дроздова Н.В. Пигменты пищевых производств (меланоиды). М. ДеЛи принт. 2008. 246 с.
19. Крамаренко В.Ф. Токсикологическая химия. М. Книга по Требованию. 2013. 445 с.
20. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem*. 1951. Vol. 193. pp. 265-275.
21. Ллойд Э., Ледерман У. Справочник по прикладной статистике. М. Финансы и статистика. 1990. 526 с.
22. Курилова Л.С., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Антонов В.Г. // *Цитология*. 2008. Т. 50. № 5. С. 452-461.
23. Рабинович С.Э., Шоно Н.И., Платонова Л.В., Дюжева Т.Г. и др. // *Биомедицинская химия*. 1997. Т.43. С. 104-111.
24. Pai E.F., Schulz G.E. // *J Biol Chem*. 1983. Vol. 258. pp. 1752-1757.
25. Voronkova Y.G., Popova T.N., Agarkov A.A., Zinovkin R.A. // *Biochemistry*. 2015. Vol. 80. pp. 1614-1621.

The use of chromatographic methods for the purification of glutathione reductase from rat livers with experimental type 2 diabetes

© 2021 Agarkov A.A., Popova T.N., Chichai A.S., Mikhaleva O.S., Popova S.E.

Voronezh State University, Voronezh

The aim of our study was to determine the activity of glutathione reductase (EC 1.6.4.2) from rat livers with experimental type 2 diabetes mellitus (T2DM) and rats who had a pathology and were dosed with 10-(6'-plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium (SkQ1). We also aimed to develop a scheme of enzyme purification by means of chromatographic methods. In our experiment, we used rat livers from the animals in the control group, rats with streptozotocin-induced type T2DM and rats with experimental hyperglycemia dosed with SkQ1. T2DM was induced by a combination of 1-month high-fat diet and a subsequent double intraperitoneal injection of streptozotocin with a 7-day interval. The dosage of streptozotocin was 30 mg per 1 kg of a rat's weight in a citrate buffer, pH 4.4. SkQ1 was injected as a 1250 mmol/kg/day solution every morning starting with the second week of the experiment. The activity of glutathione reductase (GR) was determined spectrophotometrically using a spectrophotometer SF-56 at a wavelength of 340 nm. The total amount of protein was determined by the Lowry method. The study demonstrated an increase in the activity of GR in the livers of rats with streptozotocin-induced (T2DM) as compared to the control group. It also showed that the SkQ1 injections administered to rats with pathology resulted in a decrease in the activity of the studied enzyme. Using ammonium sulfate precipitation, gel filtration through G-25, and ion exchange chromatography on DEAE-cellulose, we obtained 56.5, 45.57, and 52.9 times purified GR enzyme preparations from the livers of rats in the control group, rats with streptozotocin-induced 2D, and rats with experimental hyperglycemia dosed with SkQ1. The study demonstrated that during the ion exchange chromatography on DEAE-cellulose, the desorption of the main pool of the enzyme extracted from the rats in the control group was observed when using KCl with the concentration of 100 mmol/dm³. The same happened during the purification of the enzyme from the livers of rats with experimental hyperglycemia when using KCl with the concentration of 50 mmol/dm³. When using SkQ1 as a protector in the presence of pathology, the

GR pool, which was desorbed from DEAE-cellulose when using KCl with the concentration of 100 mmol/dm³, increased compared to the pathology. This can be explained by the changes in the net charge of the molecule of the studied enzyme under oxidative stress resulting from hyperglycemia.

Keywords: ion exchange chromatography, glutathione reductase, type 2 diabetes, free-radical oxidation, SkQ1.

References

1. Ghasemi-Dehnoo M., Amini-Khoei H., Lorigooini Z., Rafieian-Kopaei M., *Asian Pac J Trop Med.*, 2020, Vol. 13, pp. 431-438.
2. Chandra K., Singh P., Dwivedi S., Jain S., *Journal of clinical and diagnostic research*, 2019, Vol. 13, pp. BE07-BE12
3. Chikezie P.C., Ojiako O.A., Agomuo C., *International Journal of Biological Chemistry*, 2015, Vol. 9, pp. 71-79.
4. Verma S., Sagar N., Vats P., *Int J Biosays*, 2013, Vol. 2, pp. 685-690.
5. Zanozina O.V., Borovkov N.N., Shherbatyuk T.G., *Sovremennyye tekhnologii v meditsine*, 2010, No 3, pp. 104-112.
6. Inoguchi T., Li P., Umeda F., Yu H., Kakimoto M. et al., *Diabetes*, 2000, Vol. 49, pp. 1939-1945.
7. Tkachuk V.A., Vorotnikov A.V., *Sakharnyy`y diabet*, 2014, Vol. 17, No 3, pp. 29-40.
8. Pashenczeva A.V., Verbovoj A.F., Sharonova L.A., *Ozhirenie i metabolism*, 2017, Vol. 14, No 2, pp. 9-17.
9. Mishina E.E., Majorov A.Yu., Bogomolov P.O., Maczievich M.V. et al., *Sakharnyy`y diabet*, 2017, No 5, pp. 335-342.
10. Tiwari B.K., Pandey K.B., Abidi A.B., Rizvi S.I., *J Biomark*, 2013, Vol. 2013, pp. 1-8.
11. Lovat` M.L., Avrushhenko M.Sh., Averina O.A., Pavshinczev V.V., *Obshhaya reanimatologiya*, 2016, Vol. 12, No 2, pp. 6-18.
12. Roginsky V.A., Tashlitsky V.N., Skulachev V.P., *Aging.*, 2009, Vol. 1, pp. 481-489.
13. Yurova M.N., Zabezinskiy M.A., Piskunova T.S., Ty`ndy`k M.L. et al., *Uspekhi gerontologii*, 2010, Vol. 23, No 3, pp. 430-441.
14. Zinovkin R.A., Popova E.N., Pletyushkina O.Yu., Il`inskaya O.P. et al., *Obshhaya reanimatologiya*, 2018, No 2, pp. 69-86.
15. Agarkov A.A., Popova T.N., Boltysheva Y.G., *World J Diabetes*, 2019, Vol. 10, No 12, pp. 546-559.
16. Zhang M., Lv X.Y., Li J., Xu Z.G. et al., *Journal of Diabetes Research*, 2008, Vol. 2008, pp. 1-9.
17. Agarkov A.A., Semeniagina A.V., Rahmanova T.I., Popova T.N. et al., *Vestnik VGU, seriya: himiya, biologiya. farmaciya*, 2007, No 2, pp. 59-63
18. Selemenev V.F., Rudakov O.B., Slavinskaya G.V., Drozdova N.V., *Pigmenty` pishhevyy`kh proizvodstv (melanoidy`)*, M., DeLi print, 2008, 246 p.
19. Kramarenko V.F., *Toksikologicheskaya khimiya*, M., Kniga po Trebovaniyu, 2013, 445 p.
20. Lowry O.N., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., *J. Biol. Chem.*, 1951, Vol. 193, pp. 265-275.
21. Llojd E., Lederman U., *Spravochnik po prikladnoj statistike*, M., Finansy` i statistika, 1990, 526 p.
22. Kurilova L.S., Kruteczskaya Z.I., Lebedev O.E., Antonov V.G., *Czitologiya*, 2008, Vol. 50, No 5, pp. 452-461.
23. Rabinovich S.E., Shono N.I., Platonova L.V., Dyuzheva T.G. et al., *Biomeditsinskaya khimiya*, 1997, Vol. 43, pp. 104-111.
24. Pai E.F., Schulz G.E., *J Biol Chem.*, 1983, Vol. 258, pp. 1752-1757.
25. Voronkova Y.G., Popova T.N., Agarkov A.A., Zinovkin R.A., *Biochemistry*, 2015, Vol. 80, pp. 1614-1621.

Агарков Александр Алексеевич – к.б.н., доцент кафедры медицинской биохимии и микробиологии Воронежского государственного университета, Воронеж

Попова Татьяна Николаевна – д.б.н., профессор, зав. кафедрой медицинской биохимии и микробиологии Воронежского государственного университета, Воронеж

Чичай Александра Сергеевна – аспирант кафедры медицинской биохимии и микробиологии Воронежского государственного университета, Воронеж

Михалева Ольга Сергеевна – студент кафедры медицинской биохимии и микробиологии Воронежского государственного университета, Воронеж

Попова Светлана Евгеньевна – магистр кафедры медицинской биохимии и микробиологии Воронежского государственного университета, Воронеж

Agarkov Alexander A. – Ph.D (biology), associate prof., Department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh State University, Voronezh, E-mail: agalalek@mail.ru

Popova Tatyana N. – prof., grand Ph.D (biology), Department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh State University, Voronezh

Chichai Aleksandra S. – postgraduate student, Department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh State University, Voronezh, E-mail: achichaj@inbox.ru

Mikhaleva Olga S. – student, Department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh State University, Voronezh

Popova Svetlana E. – the undergraduate student, Department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh State University, Voronezh