

УДК 577.152:616.36-002  
©Коллектив авторов

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ ФОРМ NAD-ЗАВИСИМОЙ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ В НОРМЕ И ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

*Е.В. Михайлова\*, Т.Н. Попова, О.А. Сафонова*

Воронежский государственный университет, биолого-почвенный факультет,  
кафедра медицинской биохимии и микробиологии, 394693, Воронеж,  
Университетская пл., 1; тел.: (4732) 20-82-78; факс: (4732) 20-87-55;  
эл. почта: mikhailova@bio.vsu.ru

Проведена очистка и дана сравнительная характеристика некоторых каталитических свойств NAD-зависимой малатдегидрогеназы (NAD-МДГ, КФ 1.1.1.37) из митохондриальной и цитоплазматической фракций печени крыс в норме и при экспериментальном токсическом гепатите (ЭТГ). Выявлены различия в каталитических и регуляторных свойствах фермента из печени контрольных животных и крыс с ЭТГ. Показано, что ионы  $Fe^{2+}$  и  $Cu^{2+}$  оказывают ингибирующее действие на фермент, причем степень ингибирования различна в норме и при токсическом гепатите. Ионы  $Ca^{2+}$  незначительно активируют цитоплазматическую NAD-МДГ при патологии. На митохондриальную форму ионы указанного металла не оказывают влияния.

**Ключевые слова:** NAD-малатдегидрогеназа, токсический гепатит, свойства.

**ВВЕДЕНИЕ.** В последнее время большое внимание уделяется исследованию функционирования различных метаболических систем клетки в условиях интенсификации свободнорадикальных процессов. Полагают, что чрезмерное накопление активных форм кислорода (АФК) лежит в основе патогенеза многих заболеваний, в том числе и токсических поражений печени [1-3]. Одним из механизмов регуляции интенсивности процессов свободнорадикального окисления (СРО) в митохондриях может служить изменение интенсивности функционирования ключевых ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК). При этом изменяется степень восстановленности переносчиков электронтранспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий - основного источника АФК. В связи с этим привлекает интерес NAD-зависимая малатдегидрогеназа (NAD-МДГ, КФ 1.1.1.37), катализирующая в ЦТК обратимое превращение малата в оксалоацетат. Цитоплазматическая форма NAD-МДГ участвует в обеспечении транспорта метаболитов между клеточными компартментами [4]. Имеются данные о значительной роли субстрата МДГ – малата, в биохимической адаптации организма к гипоксии [5], который, поступая в митохондрии, может передавать восстановительные эквиваленты в ЭТЦ. Известно также, что малат участвует в транспорте низкомолекулярного антиоксиданта – цитрата, через биологические мембраны [6].

---

\* - адресат для переписки

В связи с вышесказанным была проведена очистка и дана сравнительная характеристика некоторых кинетических и регуляторных свойств NAD-МДГ из митохондриальной и цитоплазматической фракций гепатоцитов крыс в норме и при экспериментальном токсическом гепатите (ЭТГ).

**МЕТОДИКА.** В качестве объекта исследования использовали самцов белых лабораторных крыс массой 180-200 г. Животных содержали на стандартном рационе вивария. ЭТГ моделировали посредством введения в пищевод животного  $\text{CCl}_4$  (0,064 мл на 100 граммов веса тела) в виде раствора в вазелиновом масле после суточной пищевой депривации. На 4-е сутки печень извлекали после многократного перфузирования ледяным физиологическим раствором и использовали для дальнейших исследований. Показателем повреждения гепатоцитов при введении  $\text{CCl}_4$  служило увеличение активности аспартатаминотрансферазы в 4,9 раза и аланинаминотрансферазы в 7,7 раза в сыворотке крови крыс опытной группы относительно контроля [7].

Выделение и очистку NAD-МДГ осуществляли по схеме, включающей несколько стадий: после гомогенизации ткани печени в среде 50 мМ трис- $\text{HCl}$ -буфера (pH 8,3), содержащего 1 мМ ЭДТА, 2 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол и 0,3 М сахарозу, цитоплазматическую и митохондриальную фракции гепатоцитов разделяли методом дифференциального центрифугирования в режиме 15000 g в течение 15 минут [8]. Полученный после центрифугирования супернатант, представляющий собой в основном цитоплазматическую фракцию гепатоцитов, использовали для дальнейшей очистки фермента. Осадок митохондрий ресуспендировали в среде выделения и центрифугировали в вышеописанном режиме. Супернатант отбрасывали, а промытые митохондрии разрушали обработкой 1% тритоном X-100 в среде 50 мМ трис- $\text{HCl}$ -буфера (pH 8,3), содержащего 20% глицерин и 2 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол. Для освобождения ферментных препаратов NAD-МДГ от низкомолекулярных примесей использовали гель-фильтрацию на сефадексе G-25 (Fine). В качестве элюирующей среды использовали 10 мМ трис- $\text{HCl}$ -буфер (pH 8,3), содержащий 1 мМ ЭДТА и 2 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол. Собирали фракции объемом 3 мл и анализировали их на присутствие ферментативной активности. Фракции с максимальной ферментативной активностью объединяли и подвергали ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. Снятие фермента с носителя проводили путем ступенчатого повышения концентрации  $\text{KCl}$  в среде элюции. Элюция митохондриальной NAD-МДГ (мМДГ) происходила в диапазоне концентраций  $\text{KCl}$  0–30 мМ, цитоплазматической (цМДГ) – 35–80 мМ. Каждую фракцию объемом 2 мл анализировали на присутствие ферментативной активности. Фракции, характеризующиеся максимальной активностью, использовали для дальнейшей очистки путем гель-фильтрационной хроматографии на Toyopearl HW-65. Каждую фракцию объемом 1-2 мл анализировали на наличие ферментативной активности. Оценку чистоты полученных после заключительной стадии очистки ферментных препаратов проводили методом электрофореза (ЭФ) в полиакриламидном геле (ПААГ) [9], используя для проявления на белок нитрат серебра [10]. Окраску на специфическую активность проводили с использованием нитросинего тетразолия [11]. Полученные очищенные препараты использовали для исследования свойств фермента. Все этапы выделения и очистки осуществляли при температуре 0-4°C.

Активность NAD-МДГ определяли спектрофотометрически при 340 нм в среде 50 мМ трис- $\text{HCl}$  буфера, pH 8,3 (для цитоплазматической NAD-МДГ) и pH 8,6 (для митохондриальной NAD-МДГ), содержащего 0,2 мМ оксалоацетат (ОА), 0,15 мМ NADH. Оценку степени перекрестного загрязнения цитоплазматической и митохондриальной фракций проводили с помощью определения активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ; маркера митохондрий) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ; маркера цитоплазмы). Активность СДГ определяли при 600 нм [12]; активность ЛДГ - при 340 нм [11]. За единицу ферментативной активности (Ед) принимали количество фермента, катализирующего образования 1 мкМ продукта реакции за 1 мин при температуре 25°C.

Общий белок определяли по методу Лоури [13].

Определение констант Михаэлиса и ингибирования осуществляли по Диксону и Уэббу [14, 15].

Опыты проводили как минимум в 3-4 кратной биологической повторности, аналитические определения для каждой пробы – в двух-трех повторностях. Для статистической обработки данных применяли стандартные статистические методы [16].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Методом дифференциального центрифугирования была изучена субклеточная локализация NAD-МДГ в гепатоцитах крыс в условиях нормы и ЭТГ. Результаты исследований представлены в таблице 1. Показано, что активность фермента связана как с цитоплазматической, так и с митохондриальной фракциями. При этом около 90% активности NAD-МДГ клеток печени крысы локализовано в цитоплазме, и около 10% - в митохондриях. Распределение активности маркерных ферментов цитоплазмы и митохондрий (ЛДГ и СДГ соответственно) свидетельствует о том, что степень перекрестного загрязнения цитоплазматической и митохондриальной фракций клеток печени составила  $\approx 14\%$ .

Таблица 1. Распределение активности NAD-МДГ по субклеточным фракциям гепатоцитов крыс.

Формы NAD-МДГ	Условия опыта	Ед/г сырой массы	Удельная активность, Ед/мг белка	% от общей активности
Цитоплазматическая	Норма	49,08 $\pm$ 2,310	0,968 $\pm$ 0,047	89,69
	ЭТГ	48,41 $\pm$ 2,246	0,916 $\pm$ 0,046	91,00
Митохондриальная	Норма	5,64 $\pm$ 0,28	0,704 $\pm$ 0,035	10,31
	ЭТГ	4,79 $\pm$ 0,25*	0,613 $\pm$ 0,028*	9,00

Примечание: здесь и в таблицах 2-5 представлены средние значения  $\pm$  ошибка средней: в норме n=18, при ЭТГ n=20; \* - отличия от нормы достоверны ( $p \leq 0,05$ ).

В соответствии с полученными нами данными, в условиях токсического гепатита, вызванного введением  $\text{CCl}_4$ , происходит незначительное снижение активности митохондриальной NAD-МДГ по сравнению с нормой (в среднем на 13%). Активность NAD-МДГ из цитоплазматической фракции гепатоцитов крыс при патологии не имеет достоверных отличий от контрольных значений.

Результаты очистки NAD-МДГ из митохондрий и цитоплазмы клеток печени крыс в норме и при ЭТГ представлены в таблицах 2 и 3. С помощью разработанной схемы очистки были получены очищенные в 66,7 и 74,2 раза препараты митохондриальной формы фермента с удельной активностью 47,0 $\pm$ 2,4 и 45,5 $\pm$ 2,3 Ед/мг белка и очищенные в 77,7 и 82,9 раза ферментные препараты цитоплазматической NAD-МДГ с удельной активностью 75,2 $\pm$ 3,7 и 75,9 $\pm$ 3,7 Ед/мг белка из гепатоцитов крыс в норме и при ЭТГ соответственно. Выход составил 16,7 и 19,0% для митохондриальной, и 26,0% и 26,7% для цитоплазматической NAD-МДГ из нормальной и пораженной  $\text{CCl}_4$  печени. ЭФ в ПААГ показал, что обе формы фермента получены в гомогенном состоянии ( $R_f = 0,36 \pm 0,02$  для мМДГ и  $0,33 \pm 0,02$  для цМДГ). Значения  $R_f$  совпадали при окрашивании гелей на белок и при специфическом проявлении на активность (рис. 1). Электрофоретическая подвижность в норме и при патологии не отличалась.

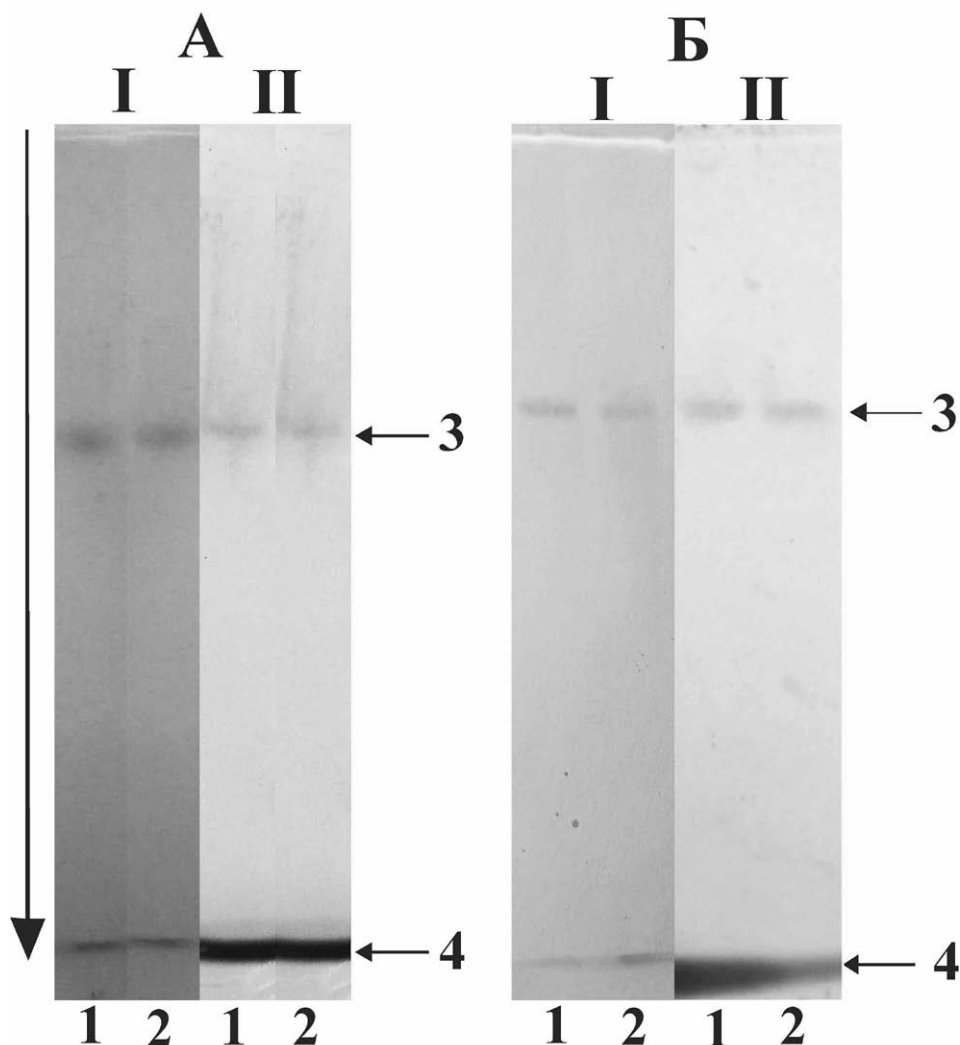
# МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗА ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ГЕПАТИТЕ

Таблица 2. Очистка митохондриальной NAD-зависимой малатдегидрогеназы из печени контрольных животных и крыс с токсическим гепатитом.

Стадии очистки	Условия опыта	Активность, Ед	Количество белка, мг	Удельная активность, Ед/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Митохондриальная фракция	Норма	5,64±0,28	8,01±0,41	0,704±0,035	100	1
	ЭТГ	4,79±0,25*	7,81±0,40	0,613±0,028*	100	1
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	Норма	5,16±0,25	6,91±0,36	0,747±0,038	91,49	1,06
	ЭТГ	4,52±0,22*	6,84±0,34	0,661±0,032*	94,36	1,08
Ионо-обменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	Норма	3,57±0,18	0,35±0,018	10,200±0,520	63,30	14,49
	ЭТГ	3,04±0,16*	0,29±0,015	10,483±0,520*	63,47	17,10
Гель-хроматография на Toyopearl HW-65	Норма	0,94±0,048	0,02±0,001	47,000±2,410	16,67	66,76
	ЭТГ	0,91±0,042	0,02±0,001	45,500±2,330	19,00	74,23

Таблица 3. Очистка цитоплазматической NAD-зависимой малатдегидрогеназы из печени контрольных животных и крыс с токсическим гепатитом.

Стадии очистки	Условия опыта	Активность, Ед	Количество белка, мг	Удельная активность, Ед/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Цитоплазматическая фракция	Норма	49,079±2,310	50,69±2,480	0,968±0,047	100	1
	ЭТГ	48,410±2,246	52,87±2,530	0,916±0,046	100	1
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	Норма	48,005±2,240	36,88±1,630	1,302±0,065	97,81	1,35
	ЭТГ	45,734±2,170	36,78±1,645	1,243±0,060	94,47	1,36
Ионо-обменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	Норма	32,196±1,450	2,34±0,110	13,759±0,070	65,60	14,21
	ЭТГ	30,398±1,440	2,13±0,105	14,271±0,070	62,79	15,58
Гель-хроматография на Toyopearl HW-65	Норма	12,782±0,565	0,17±0,075	75,188±3,655	26,04	77,67
	ЭТГ	12,902±0,555	0,17±0,080	75,890±3,670	26,65	82,85



**Рисунок 1.**

Электрофореграмма митохондриальной (А) и цитоплазматической (Б) NAD-зависимой малатдегидрогеназы из печени крыс в норме (1) и при экспериментальном гепатите (2) после проявления на белок с помощью нитрата серебра (I) и после специфического проявления на ферментативную активность с помощью нитросинего тетразолия (II): 3 - зона локализации фермента, 4 - фронт маркера (бромфеноловый синий); стрелкой показано направление движения белка при электрофорезе.

С использованием полученных гомогенных препаратов было проведено исследование некоторых кинетических параметров каталитического действия NAD-МДГ, а также влияния ионов  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$  на активность фермента из митохондриальной и цитоплазматической фракций клеток печени в норме и при токсическом гепатите.

Полученные значения  $K_m$  для ОА и NADH, определенные в двойных обратных координатах Лайнуивера-Берка, представлены в таблице 4. Установлено, что в условиях гепатита наблюдается изменение сродства NAD-МДГ к субстрату, причем для митохондриальной формы фермента характерно повышение сродства к ОА, а для NAD-МДГ из цитоплазматической фракции гепатоцитов – снижение данного параметра по сравнению с нормальными значениями. Значения  $K_m$  для NADH в норме и при ЭТГ не имеют достоверных различий.

# МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗА ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ГЕПАТИТЕ

Таблица 4. Кинетические параметры NAD-МДГ из печени крыс в норме и при токсическом гепатите.

Фракция гепатоцитов	Условия опыта	K <sub>m</sub> , mM		K <sub>si</sub> , mM		pH опт
		OA	NADH	OA	NADH	
Митохондриальная фракция	норма	0,334±0,016	0,274±0,014	-	-	8,6-9,5
	ЭТГ	0,254±0,013*	0,303±0,015	0,563±0,027	-	8,6-9,5
Цитоплазматическая фракция	норма	0,173±0,009	0,127±0,007	0,526±0,026	0,442±0,023	8,0-9,5
	ЭТГ	0,28±0,015*	0,138±0,007	0,098±0,005*	0,304±0,015*	8,0-9,0

Примечание: в норме n=10, при ЭТГ n=10; \* - отличия от нормы достоверны (p≤0,05).

При определенных концентрациях OA и NADH могут выступать в роли ингибиторов цМДГ как в норме, так и при патологии (рис. 2 и 3, табл. 4). Так, субстратное ингибирование цМДГ наблюдается при концентрации OA выше 0,6 mM, причем K<sub>si</sub> в норме превышает данный параметр для фермента из пораженной гепатотоксином печени более чем в 5 раз (рис. 2Б). Ингибирование действия фермента NADH проявляется при концентрации последнего выше 0,45 mM (рис. 3Б). Для мМДГ субстратное ингибирование OA характерно только при токсическом гепатите (рис. 2А). NADH в исследуемом диапазоне концентраций как в норме, так и при патологии не снижает активность данного фермента (рис. 3А). Выявленные изменения каталитических свойств МДГ, по-видимому, могут быть следствием изменения его структуры в условиях интенсификации СРО.

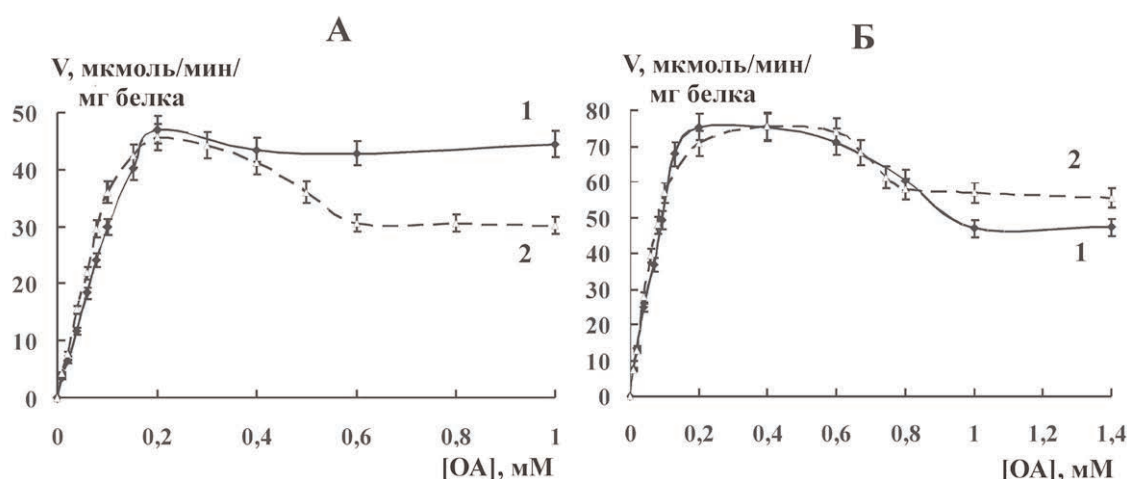


Рисунок 2.

Влияние концентрации оксалоацетата на активность митохондриальной (А) и цитоплазматической (Б) NAD-малатдегидрогеназы из печени крыс в норме (1) и при токсическом гепатите (2). Примечание: здесь и на рисунках 3-7 представлены средние значения ±ошибка средней. Здесь и на рисунках 3-4 в норме n=10, при ЭТГ n=10; достоверность p≤0,05.

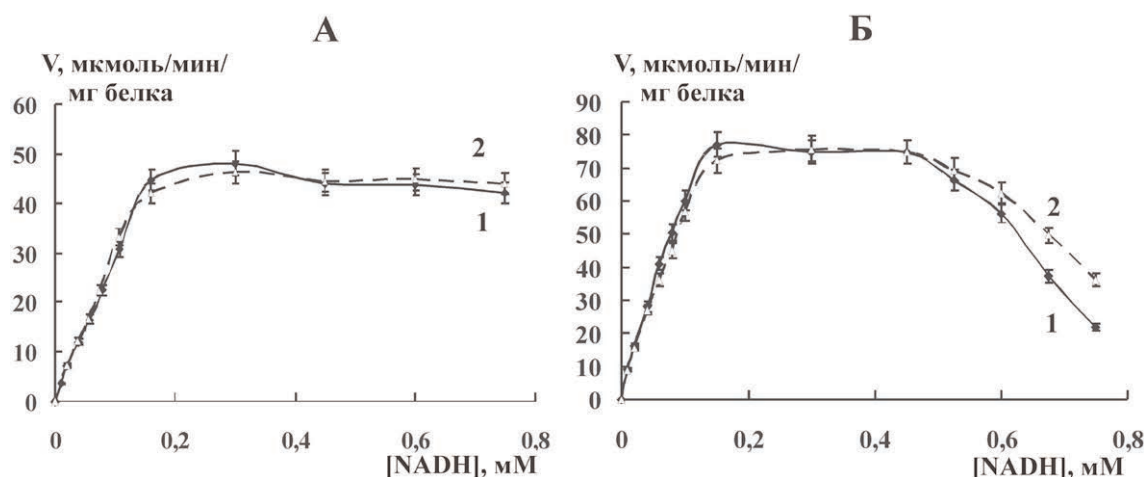


Рисунок 3.

Влияние концентрации NADH на активность митохондриальной (А) и цитоплазматической (Б) NAD-малатдегидрогеназы из печени крыс в норме (1) и при токсическом гепатите (2).

Исследование зависимости активности фермента от pH среды показало, что NAD-МДГ как в норме, так и при ЭТГ активна в широком диапазоне значений pH. Это характерно и для МДГ из других источников [17]. Установлено, что pH-оптимум для фермента из митохондриальной фракции гепатоцитов смещен в сторону более высоких значений pH относительно цМДГ и лежит в пределах 8,6-9,5, тогда как pH-оптимум цМДГ - 8,0-9,5 (табл. 4). Для цитоплазматического фермента при ЭТГ выявлено также изменение оптимального диапазона значений pH (8,0-9,0) (рис. 4Б). Кроме того, для мМДГ из печени животных с токсическим гепатитом активность в области низких значений pH выше, чем у фермента из печени контрольных животных (рис. 4А). Данные изменения в свойствах фермента также могут отражаться на его функционировании в условиях ацидоза при окислительном стрессе.

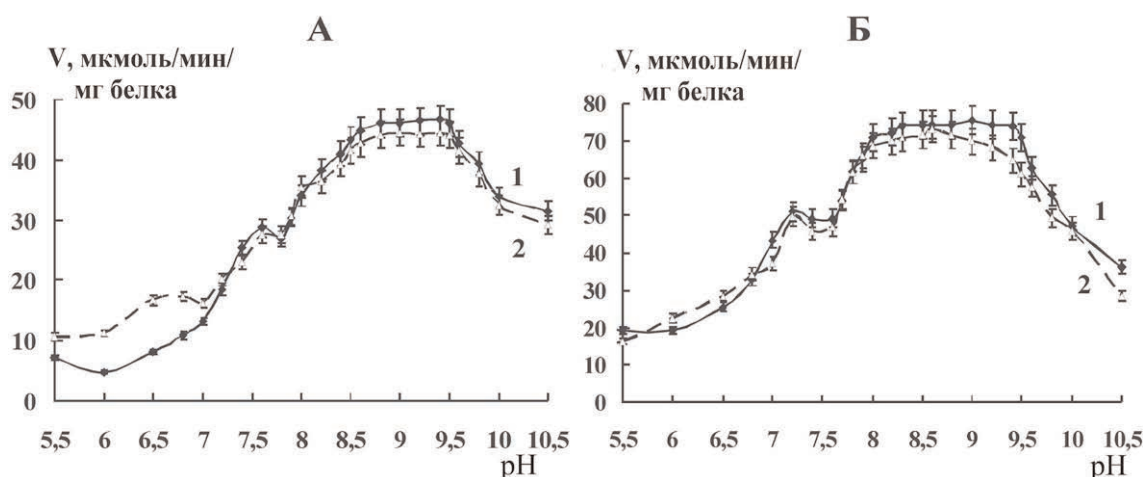


Рисунок 4.

Влияние концентрации ионов водорода на активность митохондриальной (А) и цитоплазматической (Б) NAD-малатдегидрогеназы из печени крыс в норме (1) и при токсическом гепатите (2).

# МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗА ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ГЕПАТИТЕ

Известно, что значительная роль в интенсификации свободнорадикальных процессов принадлежит прооксидантам, к которым относят, в частности, ионы  $\text{Fe}^{2+}$ . Прооксидантное действие ионов  $\text{Fe}^{2+}$  связано с их участием в образовании гидроксильного радикала – наиболее реакционноспособной АФК, в реакции Фентона, а также в разветвлении цепей пероксидного окисления липидов [18]. Большое значение при развитии процессов СРО в клетке принадлежит также и ионам меди [18, 20], и кальция [21]. В этой связи нами было проведено исследование влияния ионов  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  на функционирование NAD-МДГ из печени контрольных животных и крыс, подвергнутых ЭТГ.

Ионы  $\text{Fe}^{2+}$  оказывали ингибирующее влияние на исследуемый фермент как в норме, так и при ЭТГ (рис. 5). Показано, что мМДГ из пораженной  $\text{CCl}_4$  печени более чувствительна к действию данных ионов в концентрациях 0,1-0,2 мМ, чем фермент из печени интактных животных. При дальнейшем увеличении концентрации ингибитора более интенсивное снижение активности характерно для фермента из печени контрольных крыс. Так, при концентрации ионов  $\text{Fe}^{2+}$  2 мМ активность NAD-МДГ в норме составляет  $\approx 60\%$  от исходной, тогда как при гепатите  $\approx 90\%$ . цМДГ из печени крыс контрольной группы более устойчива к ингибирующему влиянию ионов указанного металла, чем NAD-МДГ из гепатоцитов крыс с ЭТГ. Во всех исследуемых случаях ингибирование носило смешанный характер, причем значения констант ингибирования при патологии были ниже, чем в норме (табл. 5).

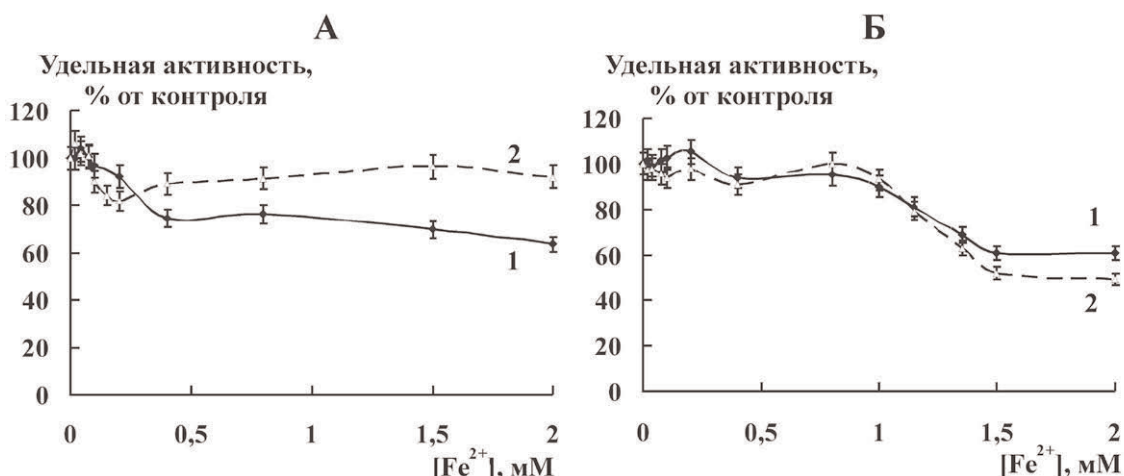


Рисунок 5.

Влияние ионов  $\text{Fe}^{2+}$  на активность митохондриальной (А) и цитоплазматической (Б) NAD-малатдегидрогеназы из печени крыс в норме (1) и при токсическом гепатите (2).

Примечание: Здесь и на рисунке 6 в норме  $n=8$ , при ЭТГ  $n=9$ ; достоверность  $p \leq 0,05$ .

Таблица 5. Значения  $K_i$  NAD-МДГ из печени крысы ионами некоторых металлов в норме и при токсическом гепатите.

Ионы	Фракция гепатоцитов	Условия опыта	$K_i$ определенная методом Диксона, мМ
$\text{Fe}^{2+}$	Митохондриальная фракция	норма	$1,11 \pm 0,058$
		ЭТГ	$0,86 \pm 0,045^*$
	Цитоплазматическая фракция	норма	$0,63 \pm 0,033$
		ЭТГ	$0,21 \pm 0,011^*$
$\text{Cu}^{2+}$	Цитоплазматическая фракция	норма	$0,47 \pm 0,022$
		ЭТГ	$0,50 \pm 0,025$

Примечание: в норме  $n=8$ , при ЭТГ  $n=9$ ; \* - отличия от нормы достоверны ( $p \leq 0,05$ ).

При исследовании влияния ионов меди на активность NAD-МДГ установлено, что данный металл также является эффективным ингибитором цМДГ, причем достоверных различий в степени ингибирования для МДГ из печени крыс контрольной и опытной групп не выявлено (рис. 6). Показано, что активность фермента при концентрации ионов  $\text{Cu}^{2+}$  2 мМ составляет  $\approx 45\%$  от исходной. В отличие от действия ионов меди на цитоплазматическую NAD-МДГ, скорость реакции, катализируемой митохондриальной формой фермента, незначительно тормозится ионами указанного металла, причём более чувствительной к их действию является МДГ из печени крыс в норме. Установлено, что ингибирование ионами  $\text{Cu}^{2+}$  также носит смешанный характер (табл. 5).

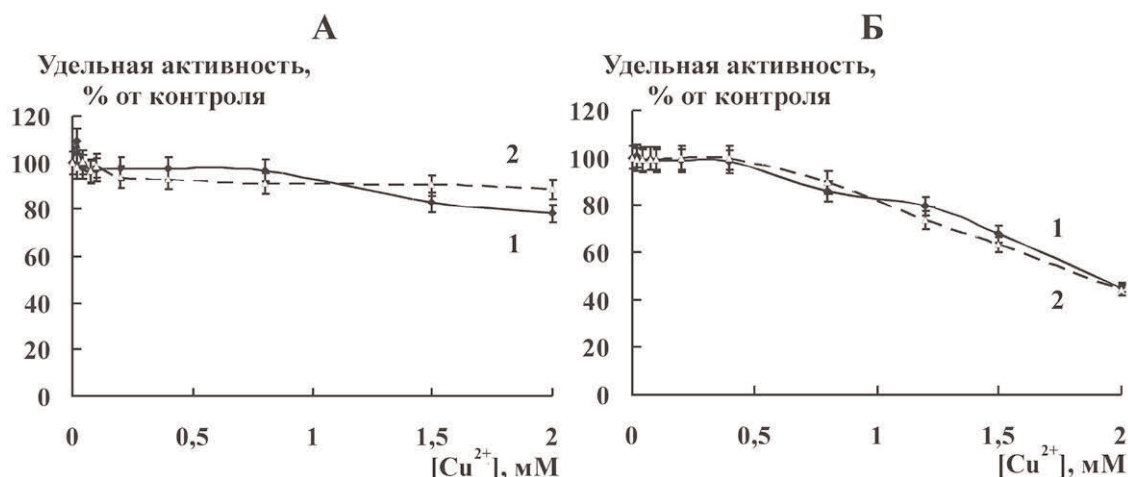


Рисунок 6.

Влияние ионов  $\text{Cu}^{2+}$  на активность митохондриальной (А) и цитоплазматической (Б) NAD-малатдегидрогеназы из печени крыс в норме (1) и при токсическом гепатите (2).

Согласно полученным результатам, ионы  $\text{Ca}^{2+}$  в диапазоне исследуемых концентраций не изменяют скорость NAD-МДГ-реакции в норме. При патологии в концентрациях 0,8-1,5 мМ ионы указанного металла незначительно активируют цитоплазматическую форму фермента (рис. 7).

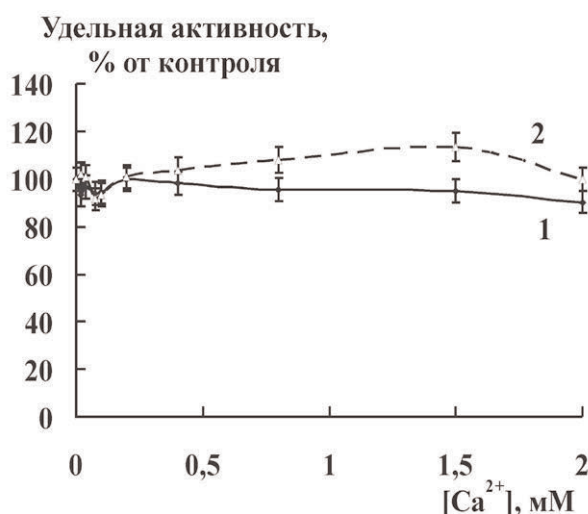


Рисунок 7.

Влияние ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на активность цитоплазматической NAD-МДГ в норме (1) и при токсическом гепатите (2). Примечание: в норме  $n=8$ , при ЭТГ  $n=9$ ; достоверность  $p \leq 0,05$ .

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Таким образом, при ЭТГ происходит незначительное изменение активности NAD-МДГ из митохондрий печени крыс, активность цитоплазматической формы практически не изменялась. Как для митохондриальной, так и для цитоплазматической формы фермента из печени крыс характерны некоторые особенности каталитического действия в условиях развития токсического гепатита: выявлено изменение  $K_m$  по отношению к ОА, степени субстратного ингибирования, а также регуляции активности фермента под действием ионов  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ , что может являться следствием модификации структуры белковой молекулы, происходящей в условиях патологии.

Работа поддержана финансированием по Программе “Развитие научного потенциала высшей школы” РНП.2.1.1.4429.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Кожевников Ю.Н. (1985) *Вопр. мед. химии*, №5, 2-7.
2. Пескин А.В. (1999) *Русский мед. журнал*, **5**, 13-15.
3. Андреещева Е.М., Попова Т.Н., Артюхов В.Г., Рахманова Т.И., Матасова Л.В. (2006) *Биомед. химия*, **52**, 153-160.
4. Ленинджер А. (1985) *Основы биохимии*, Мир, М.
5. Глотов Н.А., Шмелева Л.Т. (1973) *Укр. биохим. журн.*, **5**, 605-608.
6. Robinson B.H., Olei J. (1975) *Can. J. Biochem.*, **53**, 643-667.
7. Пашков А.Н., Попов С.С., Семенихина А.В., Рахманова Т.И. (2005) *Бюлл. эксперим. биол. мед.*, **139**, 520-523.
8. Прохорова М.И. (1982) *Методы биохимических исследований*, ЛГУ, Л.
9. Davis B.J., Jones R.G., Farmer G.R. (1964) *J. Biochem. Biophys. Methods*, **28**, 239-242.
10. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. (1996) *Anal. Chem.*, **68**, 850-858.
11. Кочетов Г.А. (1980) *Практическое руководство по энзимологии*, Высшая школа, М.
12. Cooper T.G., Beevers H. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 3507-3513.
13. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
14. Диксон М., Уэбб Э. (1982) *Ферменты: в 3-х т., Т.1* – М.: Мир.
15. Диксон М., Уэбб Э. (1982) *Ферменты: в 3-х т., Т.2* – М.: Мир.
16. Ллойд Э., Ледерман У. (1990) *Справочник по прикладной статистике*, Фин. и стат, М.
17. Пинейру де Карвалью М.А.А., Землянухин А.А., Епринцев А.Т. (1991) *Малатдегидрогеназа высших растений*, Изд-во Воронеж. ун-та, Воронеж.
18. Скулачев В.П. (1996) *Сорос. обр. журн.*, **3**, 4-16.
19. Stadtman E.R., Levine R.L. (2000) *An. N.Y. Acad. Scien.*, **899**, 191-208.
20. Кухтина Е.Н., Глуценко Н.Н. (1996) *Биохимия*, **61**, 993-997.
21. Гордеева А.В., Звягильская Р.А., Лабас Ю.А. (2003) *Биохимия*, **68**, 1318-1322.

Поступила: 19. 05. 2008.

**COMPARATIVE CHARACTERIZATION OF CATALYTIC PROPERTIES OF  
MITOCHONDRIAL AND CYTOSOLIC FORMS OF NAD-DEPENDENT  
MALATE DEHYDROGENASE FROM RATS LIVER AT NORM AND UNDER  
TOXIC HEPATITIS**

*E.V. Mikhailova, T.N. Popova, O.A. Safonova*

Voronezh State University, Biology and Soil Science Faculty, Department of Medical Biochemistry and Microbiology, University sq., 1, Voronezh, 394693 Russia; tel.: (0732) 20-82-78; fax: (0732) 20-87-55; e-mail: mikhailova@bio.vsu.ru

The purification and comparative characterization of some catalytic properties of liver mitochondrial and cytosolic NAD-dependent malate dehydrogenase (NAD-MDH; EC 1.1.1.37) from normal rats and rats with experimental toxic hepatitis (ETH) have been carried out. It has been found that there are some differences in catalytic and regulatory properties of liver NAD-MDH from control animals and rats with ETH. It has been shown that  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  ions inhibit the enzyme, and the inhibition degree is different at norm and under toxic hepatitis.  $\text{Ca}^{2+}$  ions insignificantly activate cytosolic NAD-MDH under pathology and do not influence the mitochondrial isoform.

**Key words:** NAD-dependent malate dehydrogenase, toxic hepatitis, properties.