

УДК 577.152+577.17: 616.36.002

©Коллектив авторов

ЭКСПРЕССИЯ И КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА NADP-ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ В НОРМЕ, ПРИ ВВЕДЕНИИ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ- α И ДЕЙСТВИИ ТИОКТОВОЙ КИСЛОТЫ

Л.Н. Цветикова, Т.Н. Попова, Т.И. Рахманова*, И.Ю. Искусных

Кафедра медицинской биохимии и микробиологии, биолого-почвенный факультет,
Воронежский государственный университет, Университетская пл., 1, 394693,
Воронеж; тел.: (0732) 20-82-78; факс: (0732) 20-87-55; эл. почта: rtyana@mail.ru

При развитии апоптоза происходит уменьшение количества транскриптов NADP-зависимой изоцитратдегидрогеназы (NADP-ИДГ, КФ 1.1.1.42), а также изменение каталитических свойств фермента из печени крысы по сравнению с контролем. Введение тиоктовой кислоты сопровождается изменением уровня экспрессии в сторону нормальных значений. Молекулярная масса гомогенных препаратов NADP-ИДГ из печени крыс контрольной и экспериментальных групп не отличалась, составляя $112 \pm 5,8$ кДа, однако при индукции апоптоза выявлено изменение K_m и pH-оптимума. Регуляция активности NADP-ИДГ из печени крыс исследованных групп под действием некоторых интермедиатов цикла Кребса имела различный характер.

Ключевые слова: крыса, печень, апоптоз, NADP-изоцитратдегидрогеназа, свойства, тиоктовая кислота.

ВВЕДЕНИЕ. У многоклеточных организмов апоптоз играет важнейшую роль в поддержании гомеостаза [1]. В случае нарушения этого процесса возникает ряд заболеваний, таких, например, как инфаркт миокарда, токсический гепатит и другие [2]. Известно, что в основе патогенеза многих болезней печени лежит дисбаланс между образованием активных форм кислорода (АФК) и функционированием антиоксидантной системы (АОС), осуществляющей регуляцию интенсивности свободнорадикального окисления (СРО) [3, 4]. Интенсификация СРО взаимосвязана с индукцией апоптоза, что показано на примере различных клеток [5]. При этом, стимуляция рецепторов различных типов клеток фактором некроза опухоли- α (ФНО- α) вызывает возрастание внутриклеточного уровня АФК, вследствие снижения разности трансмембранного потенциала [6, 7].

Важную роль в реализации антиоксидантной защиты играет глутатионредуктазная/глутатионпероксидазная (ГР/ГП) ферментная система, обеспечивающая детоксикацию пероксидов органического и неорганического происхождения [8]. Восстановление окисленного глутатиона происходит в ходе глутатионредуктазной реакции, функционирование которой осуществляется при постоянном притоке NADPH, образующегося, в ходе функционирования пентозофосфатного пути, [9], а также за счет реакции, катализируемой NADP-зависимой изоцитратдегидрогеназой (NADP-ИДГ, КФ 1.1.1.42) [10]. Установлено, что в условиях токсического гепатита происходит активация NADP-ИДГ [11]. Рядом авторов было выявлено, что тиоктовая кислота обладает гепатопротекторными свойствами и способствует нормализации биохимических

* - адресат для переписки

процессов при развитии оксидативного стресса [12, 13]. В связи с этим вызывает интерес изучение функционирования NADP-ИДГ из печени крысы в условиях нормы, при индукции апоптоза и действии тиоктовой кислоты.

Целью данной работы явилось исследование уровня экспрессии и каталитических свойств NADP-ИДГ из печени крысы в норме, при апоптозе, вызванном введением ФНО- α , и действии тиоктовой кислоты на фоне развития патологического процесса.

МЕТОДИКА. В качестве объекта исследования использовались самцы белых лабораторных крыс (*Rattus rattus* L.) массой 150-200 г, содержащиеся на стандартном режиме вивария. Для индукции апоптоза животным вводили актиномицин D внутривентрально в дозе 20 мкг на кг веса животного, а затем через 20 мин вводили ФНО- α (1 мкг/кг) [14, 15]. Тиоктовую кислоту после индуцирования апоптоза вводили внутривентрально (16 мг/кг), трехкратно, с интервалом 3 часа. Исследование протекторной функции тиоктовой кислоты проводили через 12 часов после введения ФНО- α , что было связано с максимальным уровнем развития свободнорадикальных процессов и степени цитолиза гепатоцитов к этому времени [16].

Изучение количественной экспрессии гена цитоплазматической NADP-ИДГ проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием набора фирмы “Синтол”, содержащего интеркалирующий краситель SYBR Green I. Эксперимент включал несколько этапов: экстракцию тотальной РНК тризольным методом, удаление примеси геномной ДНК из выделенной тотальной РНК, обратную транскрипцию и ПЦР-амплификацию в режиме реального времени на приборе iCycler BIO RAD (США). Тотальную РНК выделяли тризольным методом по Маниатису [17]. Полученный осадок РНК растворяли в 50 мкл деионизированной DEPC- H_2O , содержащей 1 единицу РНКазина. Раствор прогревали при 60°C 5 мин и использовали для электрофореза в 1% агарозном геле в присутствии формальдегида. Выделенные препараты тотальной РНК, обработанные ДНКазой I, использовали для синтеза кДНК. Для реакции обратной транскрипции 5 мкг тотальной РНК отжигали с 1 мкл олиго(dT)₁₈ (0,5 мкг/мкл) при 70°C в течение 5 мин. После этого пробирку помещали в лёд и добавляли в следующем порядке: 4 мкл 5x-ОТ буфер, 1 мкл RiboLock™ (20 мкл/мкл) и 2 мкл 10 мМ смеси нуклеотидтрифосфатов. Потом инкубировали смесь при 37°C в течение 5 мин. Далее добавляли 2 мкл M-MuLV обратной транскриптазы (20 единиц/мкл) до конечного объёма 20 мкл. Смесь инкубировали при 37°C в течение 60 мин. По истечении времени реакцию останавливали посредством нагревания при 70°C в течение 10 мин. Полученную кДНК использовали для амплификации в режиме реального времени. Параметры ПЦР реакции были следующие: 95°C – 5 мин, затем 40 циклов: 95°C – 30 сек, 60°C – 50 сек.

Для определения уровня транскриптов гена цитоплазматической NADP-ИДГ и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГДФДГ; т.н. “ген домашнего хозяйства”, house-keeping gene) использовали праймеры фирмы “ДНК-синтез”. Для расчёта разницы в экспрессии учитывали пороговый цикл для house-keeping гена (ГДФДГ).

Активность NADP-ИДГ определяли спектрофотометрически ($\lambda=340$ нм). О скорости окислительного декарбоксилирования изоцитрата судили по возрастанию оптической плотности в результате восстановления NADP. Среда для определения активности NADP-ИДГ имела следующий состав: 50 мМ трис-HCl-буфер (pH 7,8), содержащий 1,5 мМ изоцитрат, 2 мМ $MnCl_2$, 0,25 мМ NADP, 0,1 мМ ЭДТА. За единицу ферментативной активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль продукта реакции за 1 мин при температуре 25°C.

Выделение и очистку NADP-ИДГ проводили по схеме, включающей фракционирование белков сульфатом аммония, гель-фильтрацию на сефадексе G-25, ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе и хроматографию на колонке с Toyopearl HW-65.

Молекулярную массу фермента определяли методом гель-хроматографии на Toyopearl HW-65 с использованием калибровочного графика, полученного путем элюции белков-маркеров: фосфорилазы *b*, бычьего сывороточного альбумина, яичного альбумина, карбоангидразы.

Электрофорез очищенного ферментного препарата проводили в 7,5% полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Дэвиса [18]. Универсальное окрашивание белков в геле осуществляли по методике с использованием нитрата серебра [19]. Все этапы выделения и очистки фермента проводили при температуре 0-4°C.

Полученные ферментные препараты использовали для сравнительного исследования кинетических свойств и регуляции активности NADP-ИДГ в норме, при индукции апоптоза ФНО- α и действии тиоктовой кислоты на фоне развития апоптоза.

Опыты проводили в 4-кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы в 2-кратной повторности. Результаты опытов сравнивали с контролем. Статистическую обработку данных проводили на IMB PC/AT с использованием программы "Stadia".

В работе использовали: изоцитрат и NADP ("Fluka", Германия), Трис ("Serva", Германия), ДЭАЭ-целлюлозу ("Reanal", Венгрия), сефадекс G-25, ("Pharmacia", Швеция), Toyopearl HW-65 ("Toyosoda", Япония), набор для удаления примесей геномной ДНК "DeoxyribonucleaseI RNase-free" и набор для обратной транскрипции "First strand cDNA Synthesis Kit" ("Fermentas", Литва). Остальные реактивы отечественного производства марки "ч.д.а." или "х.ч."

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Выявлено повышение активности NADP-ИДГ в гомогенате печени крыс при введении ФНО- α в 1,5 раза по сравнению с интактными животными. Введение тиоктовой кислоты на фоне апоптоза приводило к снижению активности NADP-ИДГ в 1,4 раза по сравнению с животными, которым вводили ФНО- α . Очевидно, активация NADP-ИДГ играет определенную роль в развитии защитного ответа организма на интенсификацию процессов СРО. Наблюдающийся спад активности фермента при введении тиоктовой кислоты может быть связан с гепатопротекторным действием данного вещества. Известно, что эффективность биологического катализа в клетке может регулироваться как путем изменения количества фермента, так и путём регулирования его активности. Для выяснения участия в регуляции ферментативной активности механизмов на уровне синтеза было проведено исследование экспрессии NADP-ИДГ в печени экспериментальных групп животных.

Полученные нами значения пороговых циклов (Ct) свидетельствуют о неодинаковой эффективности амплификации (табл. 1). Расчет разницы экспрессии с учетом порогового цикла для ГДФДГ, т.е. для гена "домашнего хозяйства" показал, что при индукции апоптоза ФНО- α происходит уменьшение транскриптов гена цитоплазматической NADP-ИДГ в 5,6 раз относительно нормы (рис. 1). Таким образом, возрастание активности NADP-ИДГ при апоптозе, скорее всего, не сопряжено с возрастанием скорости экспрессии. Согласно литературным данным, индукция апоптоза в различных типах клеток сопровождается быстрым падением общей эффективности синтеза белка. Предполагают, что ингибирование происходит, в основном, на стадии инициации трансляции [20]. Одной из причин блокирования трансляции при апоптозе может быть деградация полиА-связывающего белка (PABP) в клетках [21]. Считается, что PABP-белок реагирует с кэп-инициаторным комплексом eIF4F и тем самым инициирует трансляцию. В результате первого цикла трансляции ядерные белки уходят с мРНК и поли(А) связывается через PABP с eIF4G, замыкая кольцо, что и активирует дальнейшую трансляцию. Нарушение в этом первом цикле приводит к быстрой деградации мРНК, начинающейся с отщепления кэпа [22]. Таким образом, нельзя исключить, что причиной уменьшения количества транскриптов гена цитоплазматической NADP-ИДГ при индукции апоптоза ФНО- α может быть ускоренное разрушение транскриптов вследствие деградации PABP-белка.

NADP-ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗА ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ АПОПТОЗЕ

Таблица 1. Разница экспрессии гена NADP-ИДГ в гепатоцитах в норме (1), при индукции апоптоза ФНО-α (2) и действии тиоктовой кислоты (3) на фоне апоптоза.

Группы животных	Ct (ГДФДГ)	Ct (NADP-ИДГ)	$\Delta Ct = Ct (NADP-ИДГ) - Ct (ГДФДГ)$	$\Delta \Delta Ct$	Разница в экспрессии
1	19,25±0,85	21,05±1,00	1,80±0,08		
2	20,00±0,95	24,30±1,12	4,30±0,19	4,3-1,8=2,5	Уровень экспрессии в группе 2 < уровня в группе 1 в $2^{2,5}$ раза
3	22,70±0,11	26,50±1,01	3,80±0,17	4,3-3,8=0,5	Уровень экспрессии в группе 2 < уровня в группе 3 в $2^{0,5}$ раза

Примечание: в таблицах 1-4 отличия от нормы достоверны ($p < 0,05$).

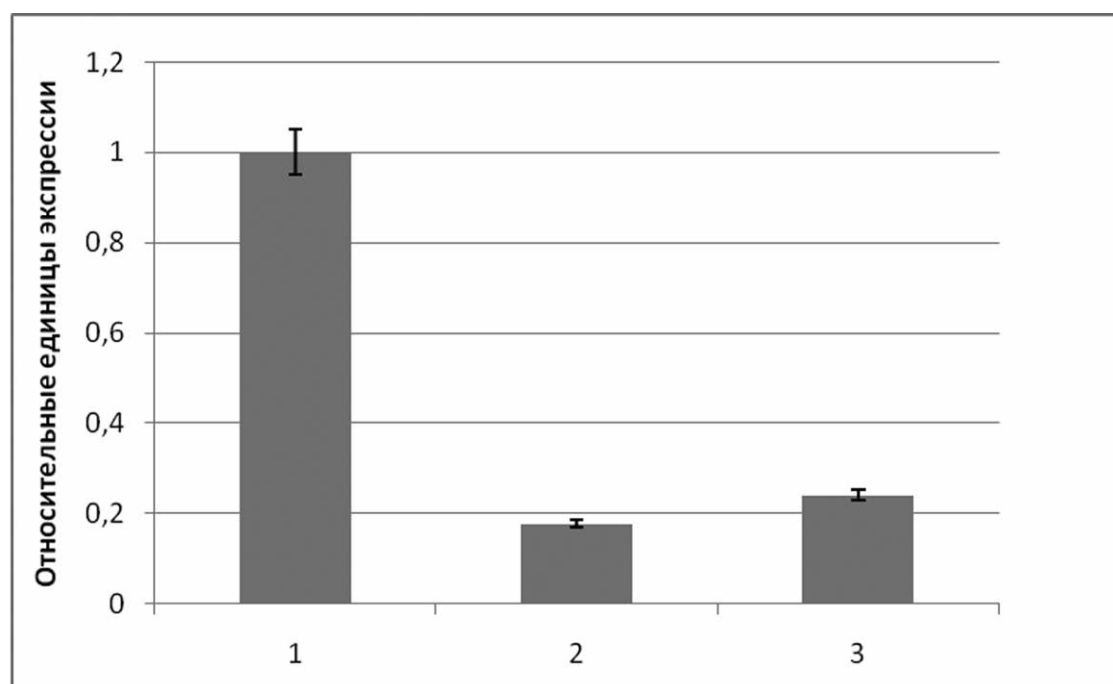


Рисунок 1.

Уровень транскриптов с гена NADP-зависимой изоцитратдегидрогеназы из печени крыс в норме (1), при введении ФНО-α (2) и действии тиоктовой кислоты на фоне развития апоптоза (3).

При введении тиоктовой кислоты на фоне индукции апоптоза наблюдалось увеличение количества транскриптов гена цитоплазматической NADP-ИДГ в 1,4 раза по сравнению с их уровнем в патологическом состоянии (рис. 1, табл. 1). К сожалению, какие-либо данные о действии тиоктовой кислоты на транскрипцию и деградацию мРНК в литературе отсутствуют. Однако можно предположить,

что благодаря антиоксидантным свойствам тиоктовой кислоты в результате её введения на фоне развития апоптоза происходит уменьшение интенсивности СРО биомолекул и, как следствие, снижение степени деградации РАВР-белка в клетках и замедление разрушения транскриптов NADP-ИДГ.

Для выяснения взаимосвязи изменений активности NADP-ИДГ с более быстрыми регуляторными механизмами, направленными непосредственно на фермент, нами были получены в результате 96,0-, 76,0- и 96,1-кратной очистки ферментные препараты NADP-ИДГ из печени контрольных крыс и животных, которым вводили ФНО- α и тиоктовую кислоту на фоне развития апоптоза с удельной активностью 8,6; 10,7 и 9,4 Е/мг белка и выходом 13,3; 12,1 и 15,7% соответственно (табл. 2).

Таблица 2: Результаты очистки NADP-зависимой изоцитратдегидрогеназы из печени крысы в норме, при введении ФНО- α и действии тиоктовой кислоты на фоне развития апоптоза.

Стадия очистки	Условия опыта	Общая активность, Е	Количество белка, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	Норма	6,95 \pm 0,32	77,33 \pm 3,93	0,09 \pm 0,01	(100)	(1)
	Введение ФНО- α	10,54 \pm 0,54	76,26 \pm 3,72	0,14 \pm 0,01		
	Введение тиоктовой кислоты при индукции апоптоза ФНО- α	7,84 \pm 0,25	73,34 \pm 3,5	0,11 \pm 0,01		
Фракционирование (NH ₄) ₂ SO ₄	Норма	5,67 \pm 0,28	18,82 \pm 0,96	0,30 \pm 0,02	81,6	3,4
	Введение ФНО- α	8,62 \pm 0,33	19,00 \pm 0,85	0,45 \pm 0,02	81,1	3,2
	Введение тиоктовой кислоты при индукции апоптоза ФНО- α	5,92 \pm 0,24	18,11 \pm 0,90	0,33 \pm 0,02	75,5	3,3
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	Норма	5,65 \pm 0,25	15,26 \pm 0,25	0,37 \pm 0,02	81,2	4,1
	Введение ФНО- α	8,72 \pm 0,35	15,65 \pm 0,24	0,55 \pm 0,02	81,8	3,9
	Введение тиоктовой кислоты при индукции апоптоза ФНО- α	6,00 \pm 0,27	14,00 \pm 0,25	0,42 \pm 0,02	76,5	4,2
Ионо-обменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	Норма	3,03 \pm 0,16	1,95 \pm 0,09	1,55 \pm 0,07	43,5	17,2
	Введение ФНО- α	4,81 \pm 0,25	2,34 \pm 0,10	2,05 \pm 0,1	45,6	15,8
	Введение тиоктовой кислоты при индукции апоптоза ФНО- α	3,25 \pm 0,17	2,46 \pm 0,14	1,32 \pm 0,07	41,4	12,0
Хроматография на Toyopearl HW-65	Норма	0,91 \pm 0,04	0,11 \pm 0,01	8,64 \pm 0,4	13,1	96,0
	Введение ФНО- α	1,35 \pm 0,05	0,13 \pm 0,01	10,64 \pm 0,5	12,1	76,0
	Введение тиоктовой кислоты при индукции апоптоза ФНО- α	1,25 \pm 0,05	0,13 \pm 0,01	9,35 \pm 0,5	15,7	93,5

NADP-ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗА ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ АПОПТОЗЕ

Электрофорез в ПААГ свидетельствует о том, что ферментные препараты NADP-ИДГ из печени исследованных групп крыс, полученные после гель-хроматографии на Toyopearl HW-65, во фракциях с максимальной активностью, были гомогенны. Значения электрофоретической подвижности для NADP-ИДГ из печени крыс контрольной и экспериментальных групп совпадали ($R_f=0,55$) (рис. 2).

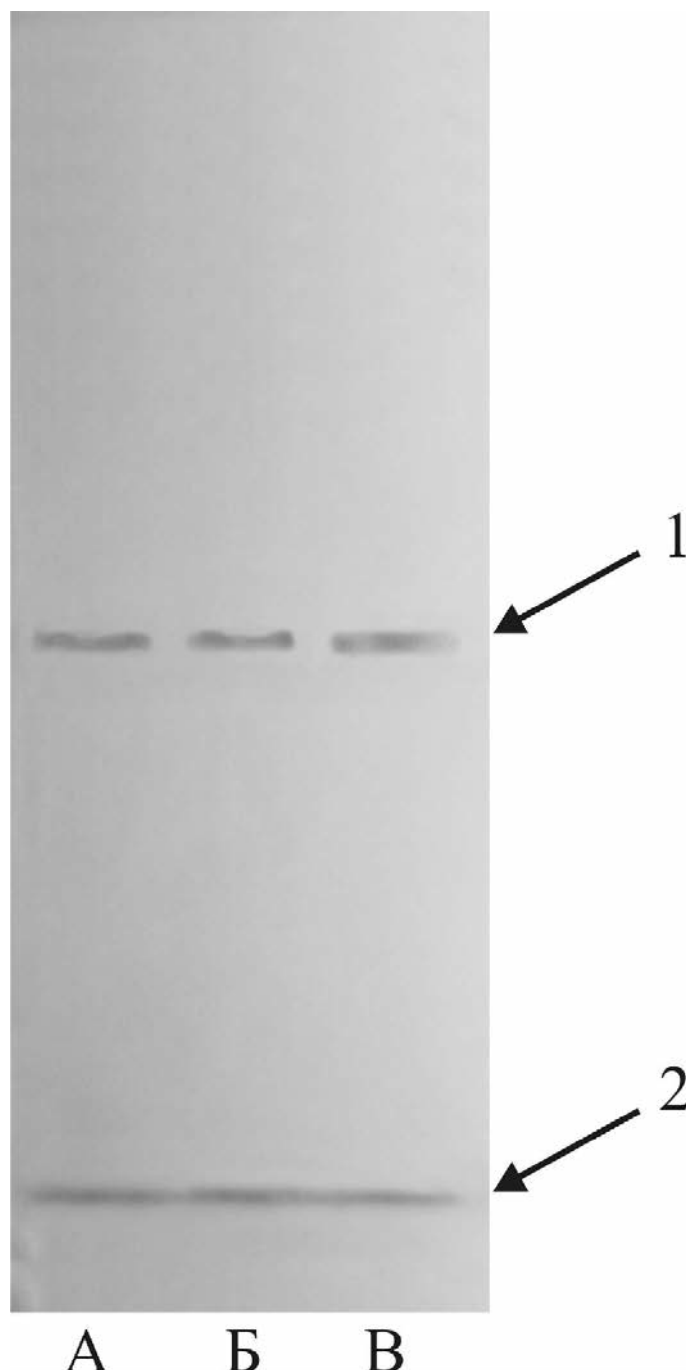


Рисунок 2.

Электрофореграмма ферментных препаратов изоцитратдегидрогеназы, выделенных из печени крыс в норме (А), при апоптозе, вызванном введением ФНО-α (Б) и действии тиоктовой кислоты на фоне развития апоптоза (В): 1-NADP-ИДГ, 2 - фронт маркера (бромфеноловый синий).

Молекулярная масса NADP-ИДГ из печени крыс в норме, при патологии и действии гепатопротектора, определенная методом гель-фильтрации через колонку с Toyopearl HW-65, составила $112 \pm 5,8$ кДа. Полученная нами величина молекулярной массы фермента близка с данными литературы для ИДГ, выделенной из других источников. Так, молекулярная масса нативной NADP-ИДГ из печени быка составляет 111 кДа [23]. Таким образом, при развитии апоптоза и действии тиоктовой кислоты не происходит изменения молекулярной массы фермента. Это свидетельствует о том, что выявленные изменения активности NADP-ИДГ при индукции апоптоза ФНО- α и введении тиоктовой кислоты, по всей видимости, не связаны с реализацией ассоциативно-диссоциативного механизма регуляции активности.

Значения K_m для изоцитрата, NADP и Mn^{2+} , определенные методом Лайнуивера-Берка, представлены в таблице 3. Полученные данные указывают, что при введении ФНО- α наблюдается уменьшение K_m для NADP и Mn^{2+} по сравнению с нормой. При введении тиоктовой кислоты значения этих параметров возрастают по сравнению с данными при патологии. Установлены оптимальные значения pH среды для активности NADP-ИДГ из печени контрольных крыс и животных экспериментальных групп, а также рассчитаны рK функциональных групп фермента по методу Курганова [24] (табл. 3). При исследовании зависимости активности NADP-ИДГ от концентрации ионов водорода выявлено смещение pH-оптимума в зону более кислых значений при развитии апоптоза. Данное явление может иметь адаптивное значение в условиях ацидоза. Из литературных источников известно, что оптимальные значения pH для NADP-ИДГ варьируют от 7,4 до 8,5 [25]. При введении протектора на фоне развития патологического состояния наблюдается смещение pH-оптимума на 0,2 единицы в сторону pH-оптимума контрольной группы. Наблюдаемые изменения, вероятно, связаны с тем, что тиоктовая кислота благодаря своим антиоксидантным свойствам снижает интенсивность свободнорадикального окисления и, соответственно, сопутствующее развитие ацидоза, что и отражается на данном показателе.

Таблица 3. Кинетические параметры NADP-изоцитратдегидрогеназы из печени крысы в норме, при введении ФНО- α и действии тиоктовой кислоты на фоне развития апоптоза

Опыт	Значения K_m , мМ			pH _{опт}	pK ₁	pK ₂
	Изоцитрат	NADP ⁺	Mn ²⁺			
Норма	0,125 \pm 0,012	0,151 \pm 0,025	0,493 \pm 0,024	7,8	7,1	8,6
Введение ФНО- α	0,130 \pm 0,011	0,061 \pm 0,024	0,395 \pm 0,019	7,5	6,8	8,3
Введение тиоктовой кислоты при индукции апоптоза	0,127 \pm 0,009	0,113 \pm 0,012	0,412 \pm 0,025	7,7	7,0	8,4

Нами было установлено подавляющее действие 2-оксоглутарата (2ОГ) и оксалоацетата (ОА) на фермент, выделенный из печени крыс контрольной группы, а также животных, подвергнутых воздействию ФНО- α . Ингибирование имело конкурентный тип по отношению к изоцитрату. Выявлено увеличение константы ингибирования (K_i) 2-ОГ в 2,1 раза, и уменьшение K_i ОА в 2,3 при развитии

NADP-ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗА ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ АПОПТОЗЕ

апоптоза по сравнению с нормой. Введение тиоктовой кислоты животным с индуцированным апоптозом сопровождается снижением степени ингибирования фермента ОА, и не влияет на K_i NADP-ИДГ 2-ОГ по сравнению с данными в патологическом состоянии (табл. 4).

Таблица 4. Константы ингибирования NADP-зависимой изоцитратдегидрогеназы из печени крысы в норме, при введении ФНО- α и действии тиоктовой кислоты на фоне развития апоптоза

Ингибитор	Значения констант ингибирования K_i , мМ		
	Норма	Введение ФНО- α	Введение тиоктовой кислоты при индукции апоптоза
2-Оксоглутарат	0,23 \pm 0,01	0,49 \pm 0,01	0,52 \pm 0,01
Оксалоацетат	1,72 \pm 0,06	0,75 \pm 0,02	1,25 \pm 0,09

Известно, что при развитии оксидативного стресса происходит увеличение концентрации цитрата [26]. Нами установлено, что цитрат активирует NADP-ИДГ, значения констант активации (K_a) составляют 0,2; 0,7 и 0,4 мМ для фермента в норме, при патологии и действии гепатопротектора соответственно (рис. 3).

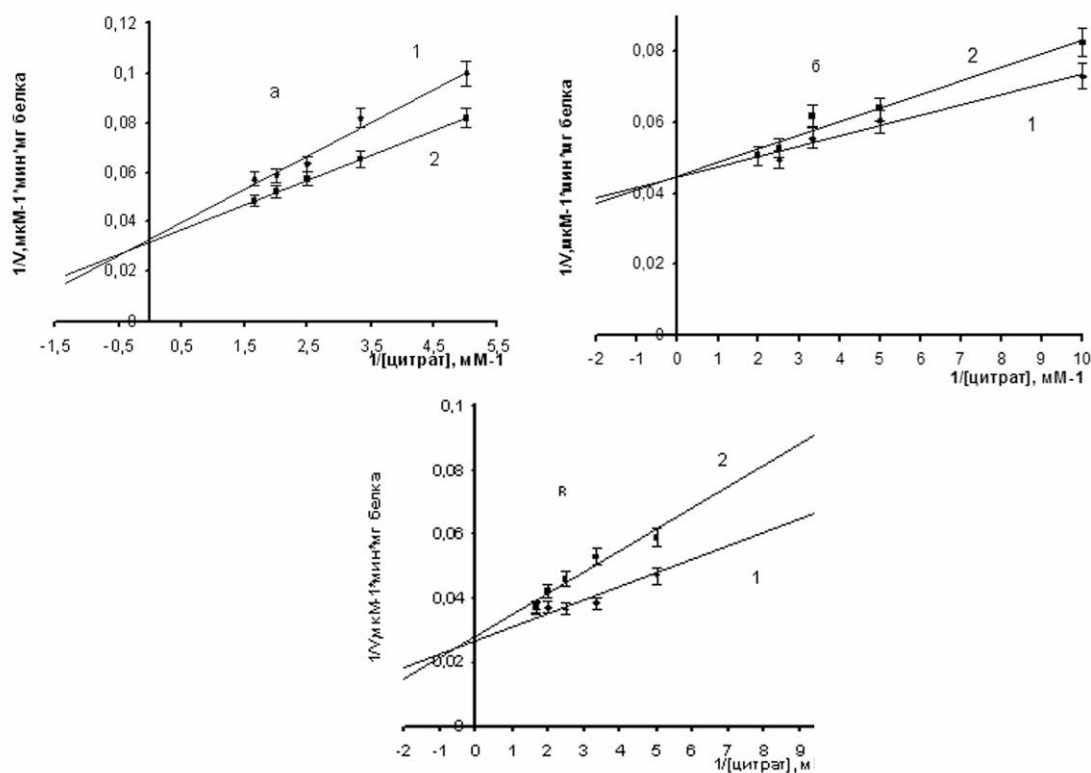


Рисунок 3.

Определение констант активации NADP-зависимой изоцитратдегидрогеназы из печени крыс в норме (А), при введении ФНО- α (Б) и действии тиоктовой кислоты на фоне развития апоптоза (В) при фиксированных концентрациях изоцитрата: 1- 1,5 мМ; 2 - 3 мМ.

Полученные результаты свидетельствуют, что при развитии апоптоза происходит уменьшение количества транскриптов NADP-ИДГ, а также изменение каталитических свойств фермента из печени крысы по сравнению с данными в норме. По всей видимости, особенности свойств и регуляции активности NADP-ИДГ в условиях развития апоптоза могут являться физико-химическим механизмом адаптационного характера, направленного на поддержание клеточного гомеостаза в условиях развития патологического процесса. Введение тиоктовой кислоты сопровождается изменением некоторых показателей каталитического действия фермента и уровня экспрессии в сторону нормальных значений, что может быть сопряжено со снижением интенсивности свободнорадикальных процессов в связи с антиоксидантным действием данного соединения.

Работа поддержана финансированием Министерства образования и науки РФ по программе “Развитие научного потенциала высшей школы” РНП.2.1.1.4429

ЛИТЕРАТУРА

1. *Jacobson M.D., Weil M., Raff M.C.* (1997) *Cell*, **88**, 347-354.
2. *Shimizu S., Narita M., Tsujimoto Y., Tsujimoto Y.* (1999) *VDAC*, **399**, 483-487.
3. *Меерсон Ф.З.* (1984) Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца, Медицина, М
4. *Skulachev V.P.* (1997) *Bioscience Reports*, **17**(3), 347-366.
5. *Busciglio J., Yankner B.A.* (1995) *Nature*, **378**(6), 776-779.
6. *Muller K.* (1992) *Eur. J. Pharmacol.*, **226**(6), 209-214.
7. *Narayanan S.* (1996) *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **26**(1), 50-59.
8. *Кулинский В.И., Колесниченко Л.С.* (1993) *Успехи соврем. биол.*, **110**(1), 20-33.
9. *Осипов А.Н., Азизова О.А., Владимиров Ю.А.* (1990) *Успехи биол. хим.*, **31**(2), 180-208.
10. *Popova T.N., Pinheiro de Carvalho M.A.A.* (1998) *Biochim. et Biophys. Acta*, **1364**(3), 307-325.
11. *Андреецева Е.М., Попова Т.Н., Артюхов В.Г., Рахманова Т.И., Матасова Л.В.* (2006) *Биомед. химия*, **52**, 153-160.
12. *Макеева А.В., Попова Т.Н., Матасова Л.В.* (2007) *Биомед. химия*, **53**, 160-175.
13. *Бустаманте Дж., Лодж Дж., Маркоччи Л.* (2001) *Международ. медиц. Журнал*, **2**, 133-141
14. *Zhao Y., Li Sh., Childs E., Kuharsky K. and Yin X.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 27432-27440.
15. *Zang G.Q., Zhou X.Q., Yu H., Xie Q., Zhao G.M., Wang B., Guo Q., Xiang Y.Q., Liao D.* (2000) *World J. Gastroenterol.*, **6**(5), 688-692.
16. *Попов С.С., Пашков А.Н. Семенихина А.В., Рахманова Т.И., Попова Т.Н., Сущенко Е.А.* (2007) Пути и формы совершенствования фармацевтического образования, создание новых физиологически активных веществ: мат. 5-й научно-метод. конф, Воронеж, 382-384.
17. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* (1984) *Молекулярное клонирование*. Мир, М.
18. *Дэвис Г.* (1970) *Электрофорез*. Мир, М.
19. *Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M.* (1996) *Anal. Chem.*, **68**, 850-858.
20. *Скулачев М.В.* (2005) *Успехи биол. химии*, **45**, 123-172.
21. *Marissen W.E., Triyoso D., Younan P., Lloyd R.E.* (2004) *Apoptosis*, **9**(1), 67-75.
22. *Воронина А.С.* (2002) *Успехи биол. хим.*, **42**, 139-160.
23. *Carlier H.M.F., Pantaloni D.* (1973) *Eur. J. Biochem.*, **37**(4), 341-354.
24. *Курганов Б.И., Петушкова Е.В.* (1992) *Биохимия*, **57**, 348-361.

25. *Pardo M.A., Llama M.J., Serra J.L.* (1999) *Biochim. Biophys. Acta. Protein Struct. and Mol. Enzymol.*, **1431**(1), 87-96.
26. *Паиков А.Н., Попов С.С., Семенихина А.В., Матасова Л.В., Попова Т.Н.* (2005) *Проблемы эндокринологии*, **51**(6), 41-43.

Поступила: 08. 05. 2008.

EXPRESSION AND CATALYTIC PROPERTIES OF RAT LIVER NADP-ISOCITRATE DEHYDROGENASE UNDER NORMAL CONDITIONS, AFTER ADMINISTRATION OF TUMOR NECROSIS FACTOR- α AND AT THIOCTIC ACID ACTION

L.N. Tsvetikova, T.N. Popova, T.I. Rakhmanova, I.Y. Iskusnykh

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

Development of apoptosis is accompanied by a decrease in transcripts of NADP-isocitrate dehydrogenase (NADP-IDH, E.C. 1.1.1.42.), and also alterations of catalytic properties from the rat liver enzyme in comparison with control. Administration of thioctic acid is increased the level of expression towards normal values. Enzyme preparations NADP-IDH were obtained from rat liver at norm conditions, after introduction of tumor necrosis factor and thioctic acid action under apoptosis. Molecular weight of homogenous preparations of NADP-IDH purified from livers of control and experimental rats was $112 \pm 5,8$ kDa, however K_m values and pH-optimum changed in apoptosis. Regulation of NADP-IDH activity under effect of some intermediates of the tricarboxylic acid cycle also differed in these groups.

Key words: liver, apoptosis, NADP- isocitrate dehydrogenase, properties, thioctic acid.