

©Коллектив авторов

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ПЕЧЕНИ КРЫС В УСЛОВИЯХ АЛЛОКСАНОВОГО ДИАБЕТА

А.Т. Епринцев*, Д.Н. Федорин, М.Ю. Бакарев

Воронежский государственный университет,
394018, Воронеж, Университетская пл., 1; *эл. почта: bc366@bio.vsu.ru

Экспериментальный аллоксановый диабет вызывает увеличение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в печени крыс, не связанное с изменением ее изоферментного состава. Это увеличение активности СДГ коррелирует с интенсификацией транскрипции генов, кодирующих каталитический димер СДГ. Анализ метильного статуса промоторов генов, кодирующих каталитический димер СДГ, у крыс в норме и при диабете не выявил зависимости с уровнем их экспрессии. Полученные результаты бисульфитного секвенирования свидетельствуют о пассивной роли эпигенетического механизма регуляции экспрессии генов СДГ при развитии аллоксанового диабета. Большое значение в контроле транскрипционной активности генов *sdha* и *sdhb* может играть транскрипционный фактор CREB, обеспечивающий активацию глюконеогенеза при диабете.

Ключевые слова: сукцинатдегидрогеназа; диабет; аллоксан; активность; экспрессия; ген; изофермент; метилирование
DOI: 10.18097/PBMC20226804272

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет представляет собой метаболическое расстройство, характеризующееся повышенным содержанием глюкозы в крови вследствие нарушения её усвоения. При диабете повреждаются бета-клетки поджелудочной железы, что приводит к различным морфофизиологическим трансформациям во всех процессах, принимающих участие в обмене глюкозы в организме [1, 2]. У больных сахарным диабетом наблюдается изменение промежуточных интермедиатов, образующихся во время глюконеогенеза. Согласно литературным данным, в лабораторных условиях широко используется модель аллоксанового диабета. Аллоксан (мезоксалиномочевина) — соединение, которое образуется при воздействии окислителей на мочевую кислоту. Главной особенностью аллоксана является то, что он вызывает избирательный некроз участков поджелудочной железы островков Лангерганса, но при этом не влияет на её внешнесекреторную ткань [3]. В качестве механизма адаптации в условиях аллоксанового диабета у крыс индуцируется процесс глюконеогенеза, обеспечивающего компенсацию глюкозы в клетке [4].

Исследование ферментативных систем, катализирующих реакции катаболизма и анаболизма, позволяет изучить адаптивную реакцию клеточного метаболизма. Одним из таких ферментов является сукцинатдегидрогеназа (СДГ; сукцинат:(акцептор)-оксидоредуктаза, КФ 1.3.5.1). Известно, что комплекс СДГ состоит из 4 субъединиц, включая 2 гидрофильные субъединицы — СДГА и СДГВ, которые обращены в матрикс и вместе образуют каталитический центр энзима, и 2 гидрофобные субъединицы — СДГС и СДГД, которые вместе

образуют анкерный домен [5]. Данный фермент занимает уникальное положение в метаболизме митохондрии, поскольку принимает участие как в цикле лимонной кислоты, окисляя сукцинат до фумарата, так и в цепи переноса электронов, восстанавливая убихинон до убихинола. СДГ имеет сложную генетическую детерминацию; при этом все субъединицы этого фермента кодируются ядерным геномом [6]. Функционирование СДГ в тканях животных при аллоксановом диабете мало изучено. Молекулярный механизм регуляции генов, кодирующих компоненты СДГ-комплекса, может осуществляться как посредством их взаимодействия с транскрипционными факторами, так и при помощи эпигенетических механизмов, в частности метилирования ДНК промоторных областей генов. Из литературных данных известно, что при стрессе у растений данный фермент изменяет свою активность за счёт регуляции экспрессии с помощью эпигенетических механизмов [7].

Метилирование ДНК представляет собой ковалентную модификацию, при которой метильная группа S-аденозилметионина (SAM) присоединяется к атому углерода-5 остатков цитозина с помощью ДНК-метилтрансфераз. В геномах позвоночных он обнаруживается в основном в контексте динуклеотидов CpG. Метилирование ДНК является важным способом регуляции генов и стабильности геномной ДНК у эукариот [7, 8]. Этот эпигенетический процесс является частью транскрипционной регуляции генов, поскольку изменения в его паттернах могут привести к аномалиям развития организмов.

Целью данного исследования было выяснение биохимических и молекулярных механизмов регуляции функционирования СДГ в печени крыс в условиях экспериментального сахарного диабета.

МЕТОДИКА

Объект исследования

Объектом исследования служили самцы белых лабораторных крыс (*Rattus norvegicus* L.) массой 150-200 г. Животных содержали в условиях вивария при стандартной температуре с естественным освещением и свободным доступом к воде и корму. Были сформированы 2 группы животных: 1 группу (контрольная, “Норма”, $n=10$) составили животные, которым вводили физиологический 0,9% раствор NaCl (масса/объём). Во 2 группу (опытная, “Диабет”, $n=10$) были включены крысы с экспериментальным сахарным диабетом.

Моделирование экспериментального аллоксанового диабета в лабораторных условиях

Для индукции экспериментального сахарного диабета использовали 5% раствор аллоксана (масса/объём) в физиологическом растворе NaCl, который инкубировали в течение 15 мин при температуре 37°C [9]. Препарат вводили в дозе 100 мг/кг массы крыс (внутрибрюшинно). Спустя 22 дня животным проводили декапитацию. В качестве биоматериала была выбрана ткань печени.

Определение концентрации глюкозы в крови у подопытных животных

Забор крови для определения содержания глюкозы осуществляли из хвостовой вены крысы. Концентрацию глюкозы определяли глюкометром Сателлит плюс (“ЭЛТА”, Россия), согласно рекомендациям производителя.

Выделение СДГ

Для получения гомогената печень крыс растирали в ступке на холоде в соотношении 1:5 к среде выделения (0,05 М Tris-HCl, pH 7,5; 0,001 М ЭДТА; 0,001 М $MgCl_2$; 0,01 М KCl). Экстракт центрифугировали со скоростью 3000 g на центрифуге Thermo Fisher Scientific SL16R (“Thermo Scientific”, США) в течение 5 мин при температуре 4°C, для дальнейших исследований использовали полученный супернатант.

Измерение активности СДГ

Активность СДГ измеряли на спектрофотометре Thermo Fisher Scientific Evolution 260 Bio (“Thermo Scientific”) при длине волны 600 нм [10]. Среда фотометрирования содержала: 30 мМ фосфатный буфер, pH 7,8, 1 мМ феназинметасульфат, 0,08 мМ дихлорфенолиндофенол, 2 мМ азид натрия, 20 мМ сукцинат натрия. Оценку степени ингибирования фермента оксалоацетатом осуществляли путём измерения исходной сукцинат-зависимой активности исследуемого фермента. После чего проводили активацию СДГ предварительной инкубацией с 1 мМ малонатом в течение 30 мин [11] и определяли активность свободного фермента. За единицу активности (Е) СДГ принимали количество фермента, которое необходимо для превращения

1 мкмоль субстрата в 1 мин при 25°C. Для определения содержания белка использовали метод Лоури. Активность ферментов выражали в виде удельной активности (Е/мг белка).

Электрофоретическое исследование СДГ

Изоферментный состав исследовали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле по методу Девиса [12]. Концентрация верхнего геля составляла 4%, а разделяющего — 7,5%. Специфическое проявление гелей осуществляли тетразолиевым методом в среде следующего состава: 0,05 М Tris-HCl буфера, pH 7,4, 0,01 М сукцинат натрия, 0,01 М феназинметасульфат и 0,01 М нитросиний тетразолий (НСТ). Электрофоретическая подвижность (R_f) — это скорость движения заряженной молекулы (см/ч) в электрическом поле с напряжённостью 1 В/см. Данный показатель определяли, как отношение длины, пройденной белковой полосой (L_1), к длине, пройденной фронтом красителя (L_2): $R_f = L_1/L_2$.

Выделение РНК

Суммарную клеточную РНК выделяли с помощью метода фенол-хлороформной экстракции с использованием в качестве осадителя LiCl [13]. Для визуализации и качественного анализа выделенных нуклеиновых кислот использовали камеру для электрофоретического разделения (“Helicon”, Россия) в 1% агарозном геле (масса/объём). Обратную транскрипцию мРНК проводили с использованием фермента М-MuLV-RT обратной транскриптазы (“Синтол”, Россия) для синтеза первой цепи кДНК согласно рекомендациям производителя.

Подбор праймеров

Для проведения анализа были использованы аннотированные нуклеотидные последовательности генов СДГ лабораторной крысы (*Rattus norvegicus* L.), взятые из международной базы данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>): *sdha* (Gene ID: 157074), *sdhb* (Gene ID: 298596). На основе нуклеотидных последовательностей мРНК с помощью программы Primer-BLAST были разработаны специфические праймеры (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) [14].

Проведение ПЦР в реальном времени

Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили на приборе Light Cycler 96 (“Roche”, Германия), используя в качестве интеркалирующего красителя SYBR Green I (“Евроген”, Россия). Для проведения реакции брали кДНК, полученную с использованием 100 нг суммарной клеточной РНК. Результаты нормировали к уровню экспрессии гена фактора элонгации *ef-1 α* . В качестве праймеров использовали нуклеотидные последовательности, приведённые в таблице 1.

Параметры амплификации: предварительная денатурация — 95°C в течение 10 мин, цикл — 95°C денатурация, 58°C отжиг, 72°C элонгация

СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗА ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ

Таблица 1. Праймеры для определения уровня транскриптов генов СДГ комплекса

Ген	Последовательность	Размер продукта
<i>sdha</i>	прямой 5'-cgcgatttctaccagttacc-3'	218
	обратный 5'-aatgccatctccagttgtcc-3'	
<i>sdhb</i>	прямой 5'-cgcttatcgctggatgatcg-3'	225
	обратный 5'-tctcctgttagtgcgccatc-3'	

(детекция). Все фазы цикла длились 30 с. Финальная элонгация — 72°C в течение 10 мин. Определение относительного уровня экспрессии исследуемых генов проводили с применением 2^{-ΔΔCt}-метода с использованием программного обеспечения Opticon Monitor™ Software (“Bio-Rad”, США).

Выделение геномной ДНК

Суммарную ДНК из печени крыс выделяли с использованием 2× ЦТАБ буфера (2% ЦТАБ, 1,4 М NaCl, 100 мМ Tris-HCl буфер (pH 8,0) 20 мМ ЭДТА) и последующей фенол-хлороформной экстракцией. В качестве осадителя использовали изопропанол (98%) и этанол (95%).

Модификация ДНК бисульфитом

Модификацию ДНК бисульфитом натрия проводили согласно ранее разработанной методике [15].

Проведение бисульфитного секвенирования

Последовательности промоторов генов *sdha*, *sdhb* использовали при разработке праймеров для бисульфитного секвенирования с помощью программы MethPrimer. Последовательности праймеров для бисульфитного секвенирования приведены в таблице 2.

Параметры амплификации: предварительная денатурация при 95°C в течение 10 мин, затем 40 циклов (95°C — 20 с, 53-55°C — 20 с, 72°C — 20 с, детекция), финальная элонгация — 72°C в течение 10 мин. Секвенирование ампликонов проводили в компании “Евроген”.

Таблица 2. Праймеры для проведения бисульфитного секвенирования генов каталитического димера СДГ комплекса

Ген	Последовательность	Размер продукта
<i>sdha</i>	прямой 5'-gttaggaggagcgtgttg-3'	260
	обратный 5'-gaataaaatcgcaaaatta-3'	
<i>sdhb</i>	прямой 5'-tataggaagttagtg-3'	288
	обратный 5'-ccattttaactcct-3'	

Статистическая обработка данных

Опыты осуществляли в трёхкратной аналитической и пятикратной биологической повторностях. Для проведения статистического анализа использовали коммерческую программу StatTech v. 1.2.0 (“Статтех”, Россия). Количественные показатели оценивали на соответствие нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Приведены средние арифметические значения и их стандартные отклонения. Данные бисульфитного секвенса представлены в виде средних значений двух биологических повторностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Индукция экспериментального диабета

К началу эксперимента содержание глюкозы в плазме крови крыс находилось в пределах нормы ($5,1 \pm 0,17$ ммоль/л) (рис. 1). На третий день эксперимента после введения аллоксана животным опытной группы уровень глюкозы в крови достигал 22,6 мМ и оставался на высоком уровне до конца эксперимента (20,4 ммоль/л). У животных контрольной группы уровень глюкозы колебался в пределах нормы 3,3-5,1 ммоль/л.

Активность СДГ в печени лабораторных крыс

Величина удельной активности СДГ печени крыс контрольной группы составляла $0,381 \pm 0,004$ Е/мг белка. У животных с аллоксановым диабетом удельная

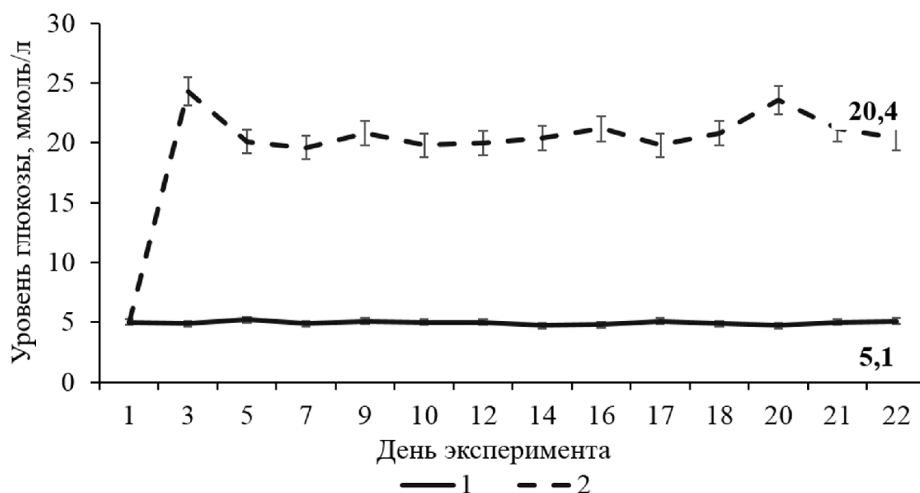


Рисунок 1. Динамика изменения уровня глюкозы в крови у крыс в норме и при аллоксановом диабете. 1 — контрольная группа крыс; 2 — животные с аллоксановым диабетом.

активность СДГ была в 1,56 раза выше ($0,595 \pm 0,006$ Е/мг белка) (рис. 2). Обработка малонатом, способствующая вытеснению прочносвязанного оксалоацетата из активного центра СДГ, увеличивала активность СДГ на 17% и 16% в случае фермента из печени крыс аллоксановым диабетом и здоровых животных соответственно. Полученные результаты указывают, что в клетках печени крыс наблюдается незначительное ингибирование активности СДГ за счёт свободного оксалоацетата. В условиях аллоксанового диабета наблюдается интенсификация работы глюконеогенеза — одного из механизмов адаптации клеточного метаболизма к стрессовым условиям [16]. Глиоксилатный цикл, являясь важнейшим этапом глюконеогенеза, осуществляет синтез из двух молекул ацетил-КоА одной молекулы сукцината, используемой для синтеза углеводов. Ранее была выявлена индукция изоцитратлиазы и малатсинтазы в печени крыс в условиях экспериментального диабета [4]. Увеличение активности СДГ в печени крыс с аллоксановым

диабетом может обуславливаться необходимостью индукции глиоксилатного цикла, обеспечивающего поставку интермедиатов для биосинтетических процессов, в том числе и для ресинтеза гликогена [17].

Изменение скорости функционирования СДГ в печени крыс с аллоксановым диабетом может осуществляться несколькими способами, в частности, путём регуляции активности СДГ или изменением изоферментного состава, либо на молекулярном уровне, за счёт контроля транскрипционной активности её генов.

Исследование изоферментного состава СДГ

В ходе исследования изоферментного состава СДГ в печени экспериментальных животных было установлено наличие одной формы фермента со значением $R_f = 0,20$ как в контрольной группе животных, так и у крыс с аллоксановым диабетом (рис. 3). Следовательно, увеличение активности СДГ не сопряжено с синтезом дополнительных изоформ, а вероятнее всего связано с изменением работы генетического аппарата клетки.

Анализ экспрессии генов СДГ

Изменение содержания транскриптов генов, кодирующих субъединицы каталитического димера (*sdha* и *sdhb*) в печени крыс в норме и при аллоксановом диабете, исследовано методом ПЦР в реальном времени, результаты которого представлены на рисунке 4.

В ходе проведённого исследования была установлена чёткая зависимость между динамикой активности СДГ в печени и изменением содержания транскриптов генов. Увеличение активности СДГ в печени крыс при развитии аллоксанового диабета соотносится с увеличением относительного уровня транскриптов генов каталитического димера СДГ,

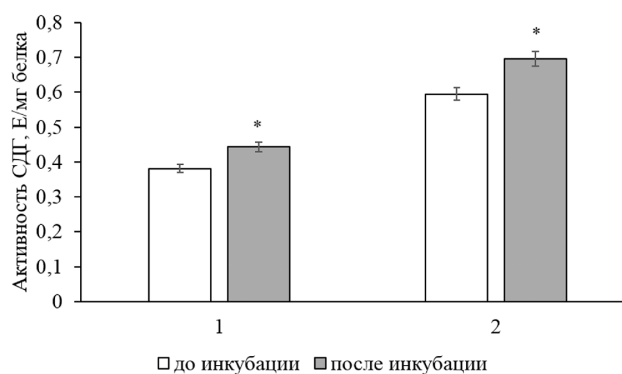


Рисунок 2. Активность СДГ в печени крыс в норме (1 – контроль) и при аллоксановом диабете (2 – опыт). * – различия показателей статистически значимы ($p < 0,01$).

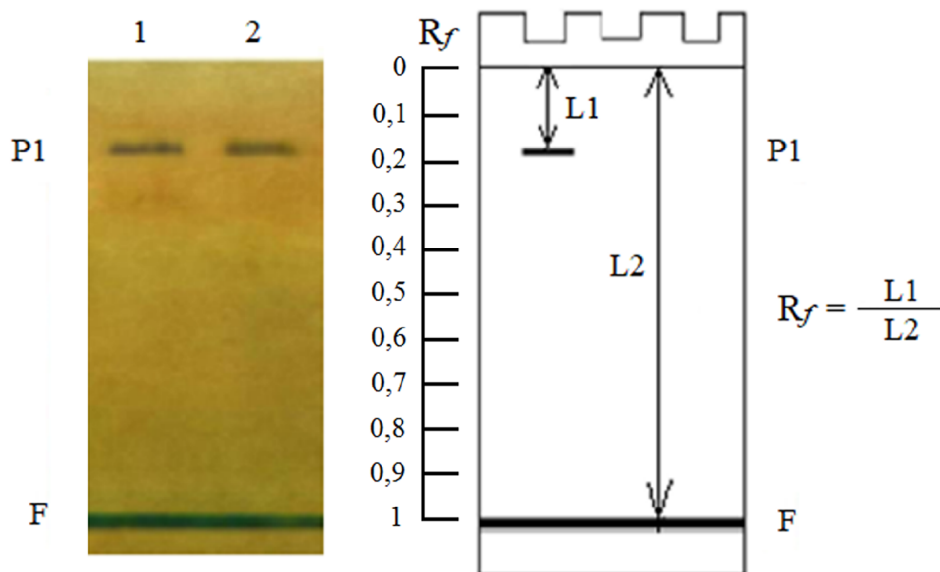


Рисунок 3. Изоферментный состав СДГ в печени крыс в норме и при аллоксановом диабете. Контрольные крысы на стандартном рационе (1), крысы с аллоксановым диабетом (2). Изоформа СДГ (P1). Фронт красителя (F) – бромфеноловый синий.

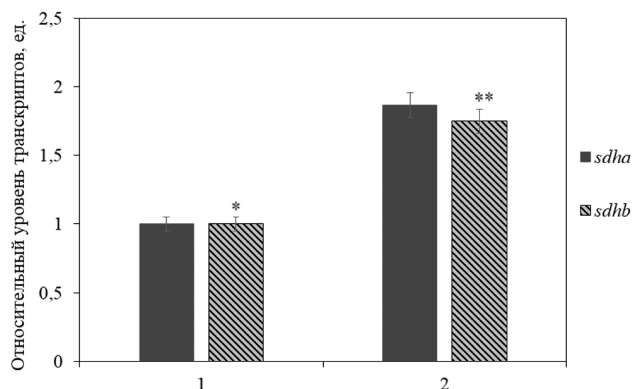


Рисунок 4. Относительный уровень транскриптов генов СДГ комплекса. Контрольные крысы на стандартном рационе (1), крысы с аллоксановым диабетом (2). При оценке относительного уровня транскрипции генов *sdha* и *sdhb* в обеих группах исследуемых животных были выявлены статистически значимые различия (* – $p < 0,001$; ** – $p = 0,047$ соответственно).

что указывает на молекулярный механизм её регуляции в печени крыс при диабете. Увеличение активности СДГ комплекса обусловлено интенсификацией синтеза дополнительных белковых компонентов субъединиц А и В, о чём свидетельствуют интенсификации экспрессии соответствующих генов в условиях развития аллоксанового диабета [18].

Механизм регуляции экспрессионной активности генов может быть осуществлён несколькими способами, в том числе за счёт действия специфических транскрипционных факторов или изменения метильного статуса промоторов.

Определение метильного статуса промоторов генов каталитического димера сукцинатдегидрогеназы

Важным моментом исследования, позволяющим оценить возможность регуляции экспрессии исследуемых генов за счёт изменения метильного статуса их промоторов, является анализ нуклеотидного состава промоторов генов, кодирующих субъединицы СДГ на характер распределения СГ-динуклеотидов в их составе. Показано, что промоторы генов каталитического димера содержат СРГ-островки: ген *sdha* содержит в своём составе два островка, а ген *sdhb* содержит один островок. Наличие СРГ-островков в составе промоторов исследуемых генов является необходимым элементом при их эпигенетической регуляции за счёт изменения метильного статуса цитозина [19, 20]. С целью выявления роли эпигенетического механизма регуляция экспрессии генов СДГ в печени крыс при аллоксановом диабете посредством изменения метильного статуса их промоторов были разработаны праймеры для бисульфитного секвенирования. Полученные на основе этих праймеров ампликоны секвенировали и проводили оценку метильного статуса СГ-динуклеотидов, входящих в их состав.

Результаты исследования показали отсутствие зависимости между статусом метилирования промоторов и относительным уровнем

транскриптов генов каталитического димера СДГ у экспериментальных животных. Для гена *sdha* наблюдается высокий процент метилирования у группы здоровых крыс (78,4%) и крыс с аллоксановым диабетом (75,0%). Установлено, что изменение метильного статуса промотора гена *sdha* не влияет содержание его транскриптов в печени крыс при развитии аллоксанового диабета (рис. 5).

Было установлено, что изменение метильного статуса промотора гена *sdhb* также не имеет корреляции с уровнями его транскриптов (рис. 6). Для гена *sdhb* также наблюдается высокий процент метилирования у группы здоровых крыс (77,7%) и крыс с аллоксановым диабетом (80,0%).

Исследование метильного статуса СГ-динуклеотидов промоторов генов каталитического димера СДГ методом бисульфитного секвенирования указывает на отсутствие зависимости между данным показателем и уровнем их транскрипции в клетках печени крыс в норме и при диабете. Во всех экспериментальных условиях в клетках печени крыс метильный статус промоторов генов *sdha* и *sdhb* практически не изменялся. Полученные результаты свидетельствует об отсутствии эпигенетической

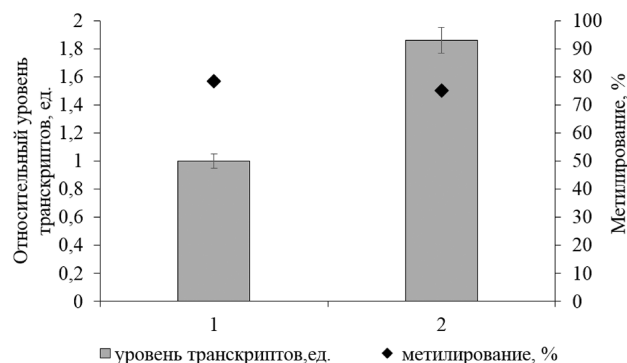


Рисунок 5. Степень метилирования СГ-нуклеотидов промотора и экспрессия гена *sdha* СДГ у крыс в условиях аллоксанового диабета. Контрольные крысы на стандартном рационе (1), крысы с аллоксановым диабетом (2).

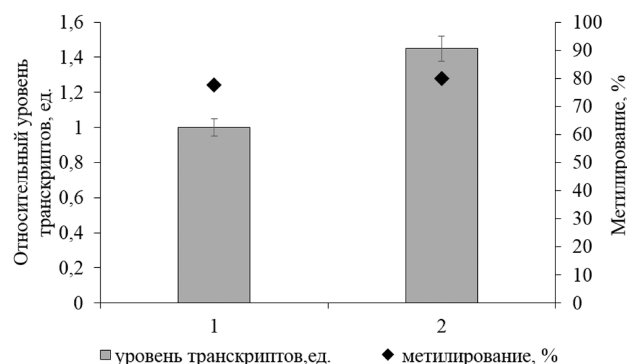


Рисунок 6. Степень метилирования СГ-нуклеотидов промотора и экспрессия гена *sdhb* СДГ у крыс в условиях аллоксанового диабета. Контрольные крысы на стандартном рационе (1), крысы с аллоксановым диабетом (2).

регуляции функционирования данного фермента путём изменения степени метилирования промоторов генов СДГ. Вероятнее всего, механизмы адаптации в условиях сахарного диабета связаны с регуляторными функциями транскрипционных факторов.

Ранее была показана активация глюконеогенеза в печени, что приводит к образованию пирувата, активации фруктозо-1,6-бисфосфатазы и глюкозо-6-фосфатазы. Экспрессия этих ферментов контролируется путём глюкагона/циклического аденозин-3',5'-монофосфата (сАМФ)/протеинкиназы А (ПКА). Этот путь фосфорилирует белок, связывающий сАМФ-зависимый фактор (CREB) в ядре, который связывается с промоторами генов этих ферментов и активирует их экспрессию. Фосфорилирование CREB является важным этапом в регуляции экспрессии генов ферментов глюконеогенеза [20]. Возможно, транскрипционный фактор CREB играет ключевую роль в регуляции транскрипционной активности генов, кодирующих каталитический димер СДГ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Увеличение активности СДГ в печени крыс с аллоксановым диабетом является одним из механизмов адаптации организма животного к стрессовым условиям, что обусловлено интенсификацией метаболических процессов, в частности цикла Кребса и глюконеогенеза. Об этом свидетельствуют данные ряда исследований, указывающие на индукцию маркерных ферментов глиоксилатного цикла в данных экспериментальных условиях — изоцитратлиазы и малатсинтазы [4]. Индукция аллоксанового диабета в клетках печени крыс не вызывает изменения изоферментного состава исследуемого фермента. Трансформация скорости функционирования СДГ при аллоксановом диабете определяется дифференциальным уровнем транскриптов её генов, увеличивая синтез белковых компонентов, что коррелирует с характером каталитической активности.

Результаты бисульфитного секвенирования указывают на отсутствие зависимости между метильным статусом промоторов генов каталитического димера СДГ и уровнем их транскрипции. Во всех экспериментальных условиях в клетках печени крыс метильный статус промоторов генов *sdha* и *sdhb* практически не изменялся. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии эпигенетического механизма в регуляции скорости функционирования СДГ в печени крыс при аллоксановом диабете. Одним из возможных механизмов регуляции генов каталитического димера СДГ может выступать изменение активности транскрипционного фактора CREB, активирующего глюконеогенез.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят компанию “Евроген” за синтез используемых в исследовании олигонуклеотидов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №20-04-00296).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры эксперимента соответствовали требованиям международных правил гуманного отношения к животным, отражённых в санитарных правилах по отбору и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Путерс-Хармел Э., Матур Р. (2008) Сахарный диабет: диагностика и лечение (пер. с англ.), Практика, Москва, 496 с. [Peters-Harmel E., Matur R. (2008) Diabetes Mellitus: Diagnosis and Treatment. Practica, Moscow, 496 p.]
2. Уоткинс П.Дж. (2006) Сахарный диабет (пер. с англ.), Бином, Москва, 134 с. [Watkins P.J. (2006) Diabetes Mellitus. Binom, Moscow, 134 p.]
3. Radenković M., Stojanović M., Prostran M. (2016) Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. J. Pharmacol. Toxicol. Methods, **78**, 13-31. DOI: 10.1016/j.vascn.2015.11.004
4. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Шевченко М.Ю. (2007) Глиоксилатный цикл. Универсальный механизм адаптации? Академкнига, Москва 231 с. [Eprincev A.T., Popov V.N., Shevchenko M.Yu. (2007) Glyoxylate cycle: A universal mechanism for adaptation, Akademkniga, Moscow, 231 p.]
5. Iverson T.M. (2012) Catalytic mechanisms of complex II enzymes: A structural perspective. Biochim Biophys Acta, **1827**(5), 648-657. DOI: 10.1016/j.bbabo.2012.09.008
6. Махмуд Али С., Епринцев А.Т. (2012) Физико-химические и каталитические свойства сукцинатдегидрогеназы из печени крыс (*Rattus rattus* L.). Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация, **2**, 144-147. [Mahmud Ali S., Eprincev A.T. (2012) Physicochemical and catalytic properties of the succinate dehydrogenase from rat liver (*Rattus rattus* L.). Vestnik VGU. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmaciya, **2**, 144-147.]
7. Козлов В.А. (2008) Метилирование ДНК клетки и патология организма. Медицинская иммунология, **10**(4-5), 307-318. [Kozlov V.A. (2008) Methylation of cellular DNA and pathology of the organism. Medicinskaya immunologiya, **10**(4-5), 307-318.] DOI: 10.15789/1563-0625-2008-4-5-307-318
8. Förster A.M. (2010) Analysis of DNA methylation in plants by bisulfite sequencing. Methods Mol. Biol., **631**, 1-11.
9. Lenzen S. (2008) The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia, **51**(2), 216-226. DOI: 10.1007/s00125-007-0886-7
10. Cimen H., Han M., Yang Y. (2010) Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria. Biochemistry, **49**(2), 304-311.

11. Ackrell B.A., Kearney E.B., Singer T.P. (1978) Mammalian succinate dehydrogenase. *Methods Enzymol.*, **53**, 466-483. DOI: 10.1016/s0076-6879(78)53050-4
12. Pollock N.L., Rai M., Simond K.S., Hesketh S.J., Teo A.C.K., Parmar M., Sridhar P., Collins R., Lee S.C., Stroud Z.N., Bakker S.E., Muench S.P., Barton C.H., Hurlbut G., Roper D.I., Smith C.J.I., Knowles T.J., Spickett C.M., East J.M., Postis V., Dafforn T.R. (2019) SMA-PAGE: A new method to examine complexes of membrane proteins using SMALP nano-encapsulation and native gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1861**(8), 1437-1445. DOI: 10.1016/j.bbmem.2019.05.011
13. Селиванова Н.В., Бакарев М.Ю., Епринцев А.Т. (2021) Выделение и идентификация генов сукцинатдегидрогеназы мембранными методами. Сорбционные и хроматографические процессы, **21**(4), 584-590. [Selivanova N.V., Bakarev M.Yu., Eprincev A.T. (2021) Isolation and identification of succinate dehydrogenase genes by membrane methods. *Sorbtsionnye i hromatograficheskie processy*, **21**(4), 584-590.] DOI: 10.17308/sorpchrom.2021.21/3643
14. Бакарев М.Ю., Быстрова Д.С., Суздальова К.И., Федорин Д.Н. (2021) Разработка олигонуклеотидных последовательностей к генам сукцинатдегидрогеназного комплекса крыс (*Rattus norvegicus* L.). Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов, **23**, 33-37. [Bakarev M.Yu., Byistrova D.S., Suzdalova K.I., Fedorin D.N. (2021) Razrabotka oligonukleotidnyh posledovatel'nostej k genam suksinatdegidrogenaznogo kompleksa krysa (*Rattus norvegicus* L.). Organizaciya i reguljaciya fiziologo-biohimicheskikh processov, **23**, 33-37.]
15. Patterson K., Molloy L., Qu W., Clark S. (2011) DNA methylation: Bisulphite modification and analysis. *J. Visualized Experiments*, **56**, e3170. DOI: 10.3791/3170
16. Petersen M.C., Vatner D.F., Shulman G.I. (2017) Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, **13**(10), 572-587. DOI: 10.1038/nrendo.2017.80
17. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Шевченко М.Ю. (2005) Экспрессия и регуляция ферментов глиоксилатного цикла, Центр. Черн. Книжное изд-во, Воронеж 22 с. [Eprincev A.T., Popov V.N., Shevchenko M.Yu. (2005) Ekspressiya i reguljaciya fermentov glioksilatnogo cikla, Centr. Chern. Knizhnoe izd-vo, Voronezh, 22 p.]
18. Бакарев М.Ю., Федорин Д.Н., Епринцев А.Т. (2018) Экспрессия генов SDHA и SDHB в печени крыс при аллоксановом диабете и действии фитопротекторов. Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов, **20**, 31-36. [Bakarev M.Yu., Fedorin D.N., Eprincev A.T. (2018) Ekspressiya genov SDHA i SDHB v pecheni krysa pri alloksanovom diabete i dejstvii fitoprotektrov. Organizaciya i reguljaciya fiziologo-biohimicheskikh processov, **20**, 31-36.]
19. Comb M., Goodman H.M. (1990) CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 3975-3982. DOI:10.1093/nar/18.13.3975
20. Bollati V., Schwartz J., Wright R.O., Litonjua A.A., Tarantini L., Suh H.H. et al. (2009) Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects. *Mech. Ageing Dev.*, **130**, 234-239.
21. Benchoula K., Parhar I.S., Madhavan P., Hwa W.E. (2021) CREB nuclear transcription activity as a targeting factor in the treatment of diabetes and diabetes complications. *Biochem Pharmacol.*, **188**, 114531. DOI: 10.1016/j.bcp.2021.114531

Поступила в редакцию: 21. 03. 2022.
После доработки: 21. 06. 2022.
Принята к печати: 30. 06. 2022.

MOLECULAR AND BIOCHEMICAL STUDIES OF SUCCINATE DEHYDROGENASE IN RAT LIVER UNDER CONDITIONS OF ALLOXAN DIABETES

A.T. Eprintsev*, D.N. Fedorin, M.Yu. Bakarev

Voronezh State University,
1 Universitetskaya sq., Voronezh, 394018 Russia; *e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Experimental alloxan diabetes in rats causes an increase in the activity of liver succinate dehydrogenase (SDH) without changes in its isozyme composition. The observed increase in the catalytic activity of SDH clearly correlates with the intensification of transcription of the genes encoding catalytic dimer of SDH. Analysis of the methyl status of the promoters of the genes, encoding the catalytic dimer of SDH in rats under normal and experimental conditions did not reveal any dependence on the level of their expression. The obtained results of bisulfite sequencing indicate a passive role of the epigenetic mechanism of regulation of SDH gene expression in the development of alloxan diabetes. The transcription factor CREB, responsible for of gluconeogenesis in diabetes, may play an important role in the control of the transcriptional activity of the *sdha* and *sdhb* genes.

Key words: succinate dehydrogenase; diabetes; alloxan; activity; expression; gene; isoenzyme; methylation

Funding. This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 20-04-00296).

Received: 21.03.2022; revised: 21.06.2022; accepted: 30.06.2022.