



УДК 577.152.193

Активность глутатионпероксидазы при нарушении функции печени и выделение фермента с использованием хроматографических методов для исследования регуляторных свойств

Шульгин К.К.¹, Попов С.С.², Рахманова Т.И.¹, Попова Т.Н.¹,
Сафонова О.А.¹, Веревкин А.Н.¹, Семенихина А.В.¹, Гончарова Е.И.¹

¹ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж

²ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Воронеж

Поступила в редакцию 23.07.2016 г.

В сыворотке крови больных неалкогольным стеатогепатитом, развивающимся при сахарном диабете 2 типа, и лекарственным гепатитом, а также в печени крыс при экспериментальном токсическом гепатите было отмечено возрастание активности глутатионпероксидазы. Проведена очистка фермента из печени крыс контрольной группы и животных с индуцированным токсическим гепатитом с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-25, ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, ультрафильтрации на ячейке Amicon и гель-хроматографии на Toyopearl HW-65. Полученные гомогенные препараты были использованы для исследования регуляторных свойств глутатионпероксидазы.

Ключевые слова: печень, гепатит, глутатионпероксидаза, активность, очистка.

The activity of glutathione peroxidase at liver function disturbance and enzyme isolation by chromatographic methods for the regulatory properties study

Shul'gin K.K.¹, Popov S.S.², Rakhmanova T.I.^{1*}, Popova T.N.¹,
Safonova O.A.¹, Verevkin A.N.¹, Semenikhina A.V.¹, Goncharova E.I.¹

¹Voronezh State University, Voronezh

²Voronezh State Medical University named by N.N. Burdenko, Voronezh

The aim of the work was to study the activity of glutathione peroxidase (GP, EC 1.11.1.9.) under liver functions disturbance, as well as the enzyme purification by chromatographic methods for further study of regulatory properties. It has been found that side by side with objective clinical signs of liver diseases, marker biochemical and immune parameters changes, there was an increase in the activity of the GP in the blood serum of patients with non-alcoholic steatohepatitis, developing under type 2 diabetes, and drug-induced hepatitis, emerged on the background of anti-tuberculosis chemotherapy, and also in rat blood serum and liver at experimental toxic hepatitis (ETG) compared to the control level. The purification of GP from rat liver in normal conditions and ETG by homogenization of the material, gel-filtration on Sephadex G-25, ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose, concentration of the enzyme fractions by ultrafiltration on Amicon cell, gel-chromatography on Toyopearl HW-65 has been carried out. As a result, the enzyme preparations with a specific activity of 1.46 and 3.64 E/ protein mg, yield 7.2 and 8.0% respectively have been obtained. Further they were used for the study of GP regulatory properties. Based on the received results we can assume that one of the mechanisms associated with the increase of the enzyme activity under

liver functions disturbance may be linked with conformational restructurings of the molecule under conditions of enhanced free radicals generation.

Keywords: liver, hepatitis, glutathione peroxidase, activity, purification.

Введение

Заболевания печени и гепатобилиарной системы являются актуальной проблемой современной медицины. В последнее время наблюдается тенденция к расширению представлений об этиологии и патогенетических основах нарушений функции печени, разрабатываются новые подходы в диагностике и прогнозе течения заболеваний данного органа [1]. Особое место занимают исследования диффузных заболеваний печени в связи с их широким распространением и негативными последствиями. Так, обследование больших групп больных криптогенным циррозом печени, показало, что в 60-80% случаев цирроз неясной этиологии формируется в исходе нераспознанного неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), который характеризуется воспалительными изменениями, индуцируемыми повышенным поступлением свободных жирных кислот, вызывающим дисфункцию гепатоцитов с развитием жировой дистрофии. Гипергликемия, гиперлипидемия и инсулинорезистентность относятся к основным факторам развития НАСГ [2]. Кроме этого, в настоящее время вследствие расширения фармацевтического рынка наблюдается четкая тенденция к росту числа лекарственных поражений печени (ЛПП). Лекарственные гепатиты (ЛГ) осложняют проводимую фармакотерапию в 1–28% случаев и в 12-25% случаев способствуют развитию цирроза печени и печеночной недостаточности [3, 4]. Если рассматривать пациентов, находящихся на противотуберкулезной полихимиотерапии, то в этом случае гораздо чаще (до 67% случаев) отмечается ЛПП, что связано с образованием гепатотоксинов, оказывающих прямое повреждающее действие на клетки печени [5]. Практически во всех случаях, независимо от этиологии заболевания гепатобилиарной системы, в печеночных клетках запускается универсальный патофизиологический механизм повреждения, связанный с синтезом активных форм кислорода, свободных радикалов и продуктов пероксидного окисления липидов (ПОЛ) – оксидативный стресс [6, 7]. Постоянный уровень свободнорадикального окисления (СО) поддерживается за счет согласованной системы антиоксидантной защиты, к ферментативному звену которой относят глутатионпероксидазу (ГП; К.Ф. 1:11.1.9.), катализирующую реакцию детоксикации органических и неорганических пероксидов без образования свободных радикалов, с использованием в качестве донора водорода восстановленного глутатиона (GSH) [8].

В связи с этим значительный интерес представляет исследование активности ГП при нарушении функции печени, а также очистка фермента с использованием хроматографических методов с целью дальнейшего исследования регуляторных свойств, что представляет как самостоятельный научный интерес, так и служит ключом к пониманию механизмов компенсации дезадаптационных сдвигов на уровне отдельных антиоксидантных ферментов при интенсификации СО.

Эксперимент

Характеристика выборки больных с НАСГ. В клиническое исследование было включено 87 человек с НАСГ, возникшим на фоне сахарного диабета 2 типа (СД2). Среди них 33 мужчины и 54 женщины. Средний возраст больных составлял 56.5 ± 17.5 года. Средняя продолжительность заболевания СД2 составляла 3.6 ± 2.7 го-

да. Диагноз НАСГ был поставлен на основании клинических признаков заболевания, биохимического исследования крови, данных ультразвукового исследования печени. При УЗИ печени у пациентов с НАСГ выявлялось усиление эхогенности печени, которое можно было оценивать как признак стеатоза.

Характеристика выборки больных с ЛГ. В клиническое исследование было включено 105 человек с ЛГ, развивающимся вследствие комплексного приема 4-5 противотуберкулезных препаратов (изониазид, стрептомицин, рифампицин, пиразинамид, этамбутол, микобутин), находящихся на стационарном лечении. Среди них 62 мужчины и 43 женщины. Средний возраст больных – 45.2 ± 7.3 года. Все пациенты были больны инфильтративным туберкулезом легких. Средняя продолжительность заболевания составляла 3.6 ± 0.4 месяца.

Характеристика контрольной группы. Контрольную группу составили 65 практически здоровых лиц в возрасте от 21 до 52 лет с нормальными показателями общего и биохимического анализов крови.

В качестве критериев исключения из исследования рассматривали: острый инфаркт миокарда, вирусные гепатиты, синдром холестаза, злокачественные новообразования, острое нарушение мозгового кровообращения, хроническую почечную недостаточность.

Для биохимических исследований в качестве исследуемого материала использовалась свежая сыворотка крови без следов гемолиза. Кровь для исследования забиралась в пробирки типа «вакутейнер» в утреннее время, натощак, из локтевой вены.

Характеристика объекта исследования при моделировании токсического поражения печени. В качестве объекта исследования использовали лабораторных белых крыс (*Rattus rattus L.*), самцов, массой 150 – 200 г. Крысы содержались на стандартном рационе питания в виварии. Животные были разделены на 2 экспериментальные группы: 1 – норма (интактные животные); 2 – животные, которым токсическое повреждение печени моделировали пероральным введением 33% раствора CCl_4 в вазелиновом масле из расчета 64 мкл CCl_4 на 100 г веса животного [9]. Материал для исследований забирали на 4 сутки после введения токсического агента. Контрольным животным вводили соответствующую аликвоту вазелинового масла.

Определение активности глутатионпероксидазы. Скорость реакции, катализируемой ГП, оценивали спектрофотометрически по уменьшению оптической плотности при длине волны 340 нм. За единицу активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее превращение 1 мкмоль субстрата за 1 минуту при $25^\circ C$. Активность фермента выражали в виде удельной активности, а также в виде Е на мл сыворотки крови и Е на грамм сырой массы печени. Определение белка проводили по методу Лоури. Среда спектрофотометрирования для определения активности ГП имела следующий состав: 50 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7.4), содержащий 1 мМ ЭДТА, 0.12 мМ NADPH, 0.85 мМ GSH, 0.37 мМ H_2O_2 , 1 ед/мл ГР. В контрольной пробе отсутствовал GSH.

Очистка ГП из печени крыс. Для получения ферментных препаратов ГП использовали схему очистки, включающую 5 стадий. Печень извлекали после многократного перфузирования ледяным физиологическим раствором. Навеску ткани печени гомогенизировали в 4-х кратном объеме среды выделения следующего состава: 0.1 М трис-HCl-буфер, рН 7.8, содержащий 1 мМ ЭДТА, 1%-ный β -меркаптоэтанол. Гомогенат фильтровали и центрифугировали при 7000 g в течение 10 мин. Супернатант, содержащий ГП, использовали для дальнейшей очистки от низкомолекулярных соединений с помощью гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25 (1.7×20 см). Образец наносили в количестве не более 20-25% от объема колонки. В качестве

элюирующей среды использовали 0.05 М трис-НСI-буфер, рН 7.6, содержащий 1 мМ ЭДТА. Скорость элюции составляла 25-30 мл/ч. Каждую фракцию объемом 2 – 3 мл анализировали на присутствие ферментативной активности. Фракции, обладающие максимальной ферментативной активностью, объединяли и использовали для дальнейшей очистки с помощью колоночной ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (1.2 x 13см). После сорбции белка проводили десорбцию фермента с помощью градиента концентрации КСI в среде элюции. Колонку промывали 50 мМ КСI, что позволяло удалить сопутствующие белки на данной стадии. Для десорбции фермента использовали 100 мМ КСI. Скорость элюции составляла 20-25 мл/час. Каждую фракцию, объемом 1.5 мл анализировали на присутствие ферментной активности и на содержание белка (по оптической плотности при 750 нм). Фракции с максимальной активностью фермента объединяли. Концентрирование фракций, содержащих активность фермента, после хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе проводили с помощью концентрирующей ячейки Amicon под давлением азота 4.2 атм. и скоростью истечения 20 мл/час. Использовали мембраны, пропускающие буферный раствор с низкомолекулярными белками (до 50 кДа). Завершающим этапом очистки была гель-хроматография на колонке с Toyopearl HW-65, размером 2.2 x 65см. Ферментный препарат наносили в объеме не более 1-3% от общего объема колонки. Элюцию проводили со скоростью 20мл/час средой того же состава, что и на предыдущих стадиях [10].

Гомогенность активной фракции фермента определяли с помощью электрофореза, который проводили в 7.5% полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Дэвиса. Универсальное окрашивание белков в геле осуществляли с использованием нитрата серебра. Все этапы выделения и очистки фермента осуществляли при температуре 0-4°C. Опыты проводили в 3-4-кратной биологической повторности, аналитические определения в каждой пробе – в 2-х повторностях. Статистическую обработку данных проводили на IBM PC/AT с использованием программы «Stadia».

Обсуждение результатов

В ходе работы установлено, что наряду с объективными клиническими признаками заболеваний печени, с изменениями маркерных биохимических показателей, а также иммунопоказателей, происходило возрастание активности ГП в сыворотке крови больных НАСГ, развивающимся при СД2, и ЛГ, а также в сыворотке крови и гомогенате печени крыс при экспериментальном токсическом гепатите по сравнению с контрольным уровнем. Так, активность фермента, выраженная в Е на мл сыворотки крови, возрастала в 1.4 раза у больных НАСГ и в 1.3 раза у больных ЛГ по сравнению с показателями контрольной группы. При этом удельная активность ГП увеличивалась в меньшей степени: в 1.3 и 1.1раза при НАСГ и ЛГ соответственно (табл.1). Такая же тенденция наблюдалась и в группе животных с экспериментальным токсическим гепатитом (ЭТГ): в печени удельная активность ГП возрастала в 2.7 раза. Активность фермента, выраженная в виде Е на грамм сырой массы, увеличивалась в 4.6 раза. Активность ГП в сыворотке крови крыс при ЭТГ также повышалась по сравнению с нормой, что, вероятно, является физико-химическим механизмом защитной реакции организма адаптационного характера на чрезмерное образование АФК при интенсификации СО в условиях развития патологии. Поскольку возникающий в процессе метаболизма ССI₄ трихлорметильный радикал повреждает клеточные мембраны и стимулирует образование гидропероксидов органических кислот и липидов, то, очевидно, на их обезвреживание и направлена работа данного

звена ферментативной АОС. Из литературных источников известно, что ГП относится к группе индуцируемых ферментов, содержание которых в клетке возрастает в результате, например, индуктивного действия органических и неорганических пероксидов. Меньшая степень изменения удельной активности, по всей видимости, связана с увеличением содержания белка при развитии патологии. Так, согласно литературным данным, при развитии СО увеличивается выработка белков теплового шока – шаперонов.

Таблица 1. Изменение активности глутатионпероксидазы в сыворотке крови у больных с неалкогольным стеатогепатитом, развивающимся при сахарном диабете 2 типа, и в группе больных с лекарственным гепатитом по сравнению с контрольными значениями*

Активность ГП	Контроль	НАСГ	ЛГ
Е/см ³	0.1230±0.0080	0.1770±0.0100	0.1570±0.0090
Е/мг белка	0.0020±0.0001	0.0027±0.0001	0.0022±0.0001

*Примечание: отличия от нормы достоверны (уровень значимости - $p \leq 0.05$).

Известно, что эффективность биологического катализа в клетке может регулироваться как путем изменения количества фермента, так и путем регулирования его активности. Для выяснения взаимосвязи изменений активности ГП с более быстрыми регуляторными механизмами, направленными непосредственно на фермент, были разработаны способы очистки и получены гомогенные ферментные препараты ГП из печени крыс контрольной группы и животных с ЭТГ (табл. 2).

Таблица 2. Очистка глутатионпероксидазы из печени крыс контрольной группы и животных с токсическим гепатитом*

Стадия очистки		Общая активность Е _{общ}	Количество белка, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход,%	Степень очистки
Гомогенат	норма	2.64±0.11	203.00±9.74	0.013±0.001	100	1
	ЭТГ	9.34±0.34	267.00±8.54	0.035±0.000	100	1
Хроматография на сефадексе G-25	норма	2.38±0.07	122.00±2.81	0.019±0.000	90.15	1.46
	ЭТГ	7.94±0.26	103.00±4.12	0.077±0.002	85.01	2.20
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	норма	1.06±0.03	2.08±0.08	0.510±0.015	40.15	39.23
	ЭТГ	2.72±0.11	1.76±0.07	1.545±0.052	29.12	44.14
Концентрирование с помощью ячейки Amicon	норма	0.53±0.02	0.57±0.03	0.930±0.037	20.07	71.54
	ЭТГ	2.05±0.09	0.86±0.02	2.384±0.083	21.95	68.11
Хроматография на Toyopearl HW-65	норма	0.19±0.01	0.13±0.01	1.462±0.044	7.20	112.46
	ЭТГ	0.75±0.03	0.21±0.01	3.644±0.178	8.00	104.11

*Примечание: отличия от нормы достоверны (уровень значимости - $p \leq 0.05$).

Ключевыми стадиями в схеме очистки являлись ионообменная хроматография и концентрирование ферментного препарата с помощью ячейки. Применение ДЭАЭ-целлюлозы позволило получить ГП с высокой степенью очистки, что было достигнуто путем использования ступенчатого градиента КС1 50-100 мМ. Использование концентрирующей ячейки также существенно увеличило степень очистки фермента.

К настоящему времени установлено, что ионам таких металлов, как Fe²⁺, Ca²⁺ принадлежит значительная роль в развитии процессов СО.

Установлено, что ионы Fe^{3+} оказывают ингибирующее влияние неконкурентного типа на исследуемый фермент, как в условиях нормы, так и при ЭТГ. Полученные значения константы ингибирования (K_i) составили 9.5 мМ в норме, 2.8 мМ при ЭТГ. Снижение значения K_i , наблюдаемое при токсическом гепатите, свидетельствует о большей чувствительности фермента к ингибирующему действию данных ионов при патологии.

Ионы Fe^{2+} оказывают сходное ингибирующее действие практически на всем диапазоне исследуемых концентраций, как в норме, так и при ЭТГ. Данные ионы ингибируют ГП по неконкурентному типу с K_i 5.9 мМ в условиях нормы и K_i 3.1 мМ при ЭТГ. Таким образом, можно предположить, что модификация чувствительности ГП к ингибирующему влиянию ионов железа может быть сопряжена с изменением концентрации данных ионов в клетке при патологии.

Нарушение внутриклеточного гомеостаза Ca^{2+} , сопровождающееся существенным повышением его концентрации в цитоплазме клетки, лежит, как полагают, в основе механизма клеточной гибели при целом ряде патологических состояний. Цитотоксическое действие самых разных токсикантов также, хотя бы отчасти, связано с повышением уровня кальция внутри клеток [11, 12]. В ходе работы показано, что ионы Ca^{2+} также могут принимать участие в регуляции активности ГП. Так, в норме и при ЭТГ при концентрации данного иона 0.05 мМ происходит ингибирование активности фермента, однако для ГП из пораженной гепатотоксином печени этот эффект более выражен. При увеличении концентрации ионов Ca^{2+} в условиях нормы происходит незначительная стимуляция активности, а при концентрации более 0.1 мМ практически не наблюдается влияния на фермент. При ЭТГ данные ионы также не оказывают значительного влияния на исследуемый фермент.

Заключение

Таким образом, установлено, что происходит увеличение активности ГП как в сыворотке крови больных с НАСГ, развивающимся при СД2, так и ЛГ, возникшем на фоне противотуберкулезной терапии, а также в группе животных с ЭТГ по сравнению с контрольными значениями. Для выяснения возможных физико-химических механизмов изменения активности фермента были разработаны способы очистки ГП из печени крыс исследуемых групп животных. Исследование свойств ГП с применением очищенных ферментных препаратов позволяет предполагать, что одним из механизмов, сопряженных с возрастанием активности фермента при нарушении функции печени, могут быть конформационные перестройки молекулы в условиях усиленной генерации свободных радикалов.

Работа поддержана стипендией Президента РФ молодым ученым СП-1606.2015.4.

Список литературы

1. Болезни печени и желчевыводящих путей: руководство для врачей / Под ред. В.Т. Ивашкина. М.: ООО Издат. дом «М-Вести». 2002. 416 с.
2. Попов С.С., Пашков А.Н., Агарков А.А., Золоедов В.А. и др. // *Вестник новых медицинских технологий*. Электронное издание. 2014. № 1. С. 70.
3. Широкова Е.Н. Лекарственные поражения печени. Лекция на Всероссийском Интернет Конгрессе специалистов по внутренним болезням(2012). Видеоархив. Режим

доступа:

(http://www.internist.ru/articles/vnutrennie/vnutrennie_671.html).

4. Байкова И.Е., Никитин И.Г. // *Русский медицинский журнал*. 2009. № 1. С. 4-10.

5. Возненко А.А. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Москва, 2012. 22 с.

6. Буеверов А.О. // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2002. № 4. С. 21-25.

7. Попов С.С., Пашков А.Н., Золоедов В.И., Шведов Г.И. // *Клиническая медицина*. 2013. Т. 91. № 3. С. 50-53.

8. Горбенко М.В., Попова Т.Н., Шулгин К.К., Попов С.С. // *Экспериментальная и*

клиническая фармакология. 2013. Т. 76. № 10. С. 12-15.

9. Моделирование патологических процессов в печени / Под ред. А.Ф. Блюгер. Рига: Звайгзне. 1975. 180 с.

10. Рудаков О.Б., Селеменов В.Ф. Физико-химические системы сорбат-сорбент-элюэнт в жидкостной хроматографии. Воронеж. изд. ВГУ. 2003. 300 с.

11. Torrielli M.V., Dianzani M.U. // *Free Radicals in molecular Biology, Aging, and Disease*. N.Y.: Raven press. 1984. pp. 355-379.

12. Каган В.Е., Архипенко Ю.В., Козлов Ю.П. // *Биохимия*. 1983. Т. 48, № 1. С. 158-166.

References

1. Bolezni pecheni i zhelchevyvodyashchikh putei: rukovodstvo dlya vrachei / Pod red. V.T. Ivashkina, M., ООО Izdat. dom «M-Vesti», 2002, 416 p.

2. Popov S.S., Pashkov A.N., Agarkov A.A., Zoloedov V.A. et al., *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii*, Elektronnoe izdanie, 2014, No 1, pp. 70.

3. Shirokova E.N. Lekarstvennye porazheniya pecheni. Lektsiya na Vserossiiskom Internet Kongresse spetsialistov po vnutrennim boleznyam(2012). Videoarkhiv. Available at: ([internist.ru](http://www.internist.ru) http://www.internist.ru/articles/vnutrennie/vnutrennie_671.html).

4. Baikova I.E., Nikitin I.G., *Russkii meditsinskii zhurnal*, 2009, No 1, pp. 4-10.

5. Voznenko A.A. Avtoref. dis. ... kand. med. Nauk, M., 2012, 22 p.

6. Bueverov A.O., *Rossiiskii zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*, 2002, No 4, pp. 21-25.

7. Popov S.S., Pashkov A.N., Zoloedov V.I., Shvedov G.I., *Klinicheskaya meditsina*, 2013, Vol. 91, No 3, pp. 50-53.

8. Gorbenko M.V., Popova T.N., Shul'gin K.K., Popov S.S., *Ekspperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*, 2013, Vol. 76, No 10, pp. 12-15.

9. Modelirovanie patologicheskikh protsessov v pecheni / Pod red. A.F. Blyuger. Riga: Zvaigzne, 1975, 180 p.

10. Rudakov O.B., Selemenev V.F. Fiziko-khimicheskie sistemy sorbat-sorbent-elyuent v zhidkostnoi khromatografii, Voronezh, izd. VGU, 2003, 300 p.

11. Torrielli M.V., Dianzani M.U., *Free Radicals in molecular Biology, Aging, and Disease*. N.Y., Raven press, 1984, pp. 355-379.

12. Kagan V.E., Arkhipenko Yu.V., Kozlov Yu.P., *Biokhimiya*, 1983, Vol. 48, No 1, pp. 158-166.

Шулгин Константин Константинович – доцент кафедры медицинской биохимии и микробиологии, к.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, тел. 8(473)2281160, доп. 1111.

Попов Сергей Сергеевич – доцент кафедры госпитальной терапии и эндокринологии, к.м.н., Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н.Бурденко, Воронеж

Рахманова Татьяна Ивановна – доцент кафедры медицинской биохимии и микробиологии, к.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж

Shul'gin Konstantin K. – Ph.D (biology), associate prof., Department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh State University, Voronezh, *E-mail*: KKShulgin@mail.ru

Popov Sergey S. – Ph.D (medicine), associate prof., Department of hospital therapy and endocrinology, Voronezh State Medical University named by N.N. Burdenko, Voronezh

Rakhmanova Tatyana I. – Ph.D (biology), associate prof., Department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh State University, Voronezh, *E-mail*: rtyana@mail.ru

Попова Татьяна Николаевна – профессор, зав. кафедрой медицинской биохимии и микробиологии, д.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж

Сафонова Ольга Анатольевна – доцент кафедры медицинской биохимии и микробиологии, к.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж

Веревкин Алексей Николаевич - аспирант кафедры медицинской биохимии и микробиологии, Воронежский государственный университет, Воронеж

Семенихина Анастасия Владимировна - доцент кафедры медицинской биохимии и микробиологии, к.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж

Гончарова Елена Ивановна – магистрант кафедры медицинской биохимии и микробиологии, Воронежский государственный университет, Воронеж

Popova Tatyana N. – prof., grand Ph.D (biology), Department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh State University, Voronezh, *E-mail:* popova@bio.vsu.ru

Safonova Olga A. –Ph.D (biology), associate prof., Department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh State University, Voronezh, *E-mail:* Solya333@mail.ru

Verevkin Aleksey N. - PhD student, Department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh State University, Voronezh, *E-mail:* wer.all@mail.ru

Semenikhina Anastasia V. - Ph.D (biology), associate prof., Department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh State University, Voronezh, E-mail: semenikhina@bio.vsu.ru

Goncharova Elena I. – student on Master’s program, Department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh State University, Voronezh, *E-mail:* Goncharovaelena93@mail.ru