



УДК 543:577.15:616.36-002:616.43

Применение различных видов хроматографии для очистки глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы из патологически измененной печени крыс

Сафонова О.А., Шульгин К.К., Агарков А.А., Попова Т.Н., Саиди Л.

Воронежский государственный университет, Воронеж

Поступила в редакцию 19.05.2011 г.

Аннотация

Глутатионпероксидаза (ГП; КФ 1.11.1.9) из печени крыс контрольной группы, животных с экспериментальными токсическим гепатитом (ЭТГ) и гипертиреозом (ЭГТ) очищена в 39,2; 44,1 и 31,5 раз соответственно с использованием методов гель-фильтрации через сефадекс G-25 и ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. С применением методов фракционирования сульфатом аммония, гель-фильтрации через сефадекс G-25 и ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе получена очищенная в 56,4; 48,8 и 62,3 раз глутатионредуктаза (ГР, КФ 1.6.4.2) из печени крыс в норме, при ЭТГ и ЭГТ. На очищенных препаратах исследованы зависимости скорости реакции, катализируемой данными ферментами, от концентрации субстрата и кофермента, pH среды, концентрации ионов магния, а также влияние цитрата на функционирование ГП и ГР.

Ключевые слова: глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, хроматографические методы очистки, печень крысы, токсический гепатит, гипертиреоз.

Glutathione peroxidase (GP; EC 1.11.1.9) has been purified in 39.2; 44.1 и 31.5 times from liver of control group rats, animals with experimental toxic hepatitis (ETH) and hyperthyroidism (EHT) accordingly by gel-filtration on Sephadex G-25 and ion-exchange chromatography on DEAE-Cellulose. Purified in 56.4; 48.8 и 62.3 times glutathione reductase (GR; EC 1.6.4.2) from rat liver at norm, under ETH and EHT has been obtained by ammonium sulfate fractionation, gel-filtration on Sephadex G-25 and ion-exchange chromatography on DEAE-Cellulose. Using purified enzyme preparations the dependence of GP- and GR-reaction rate from substrate and coenzyme concentration, medium pH, magnesium ions concentration and also citrate influence on the enzymes functioning have been investigated.

Keywords: glutathione peroxidase, glutathione reductase, chromatographical methods of purification, rat liver, toxic hepatitis, hyperthyroidism

Введение

Одной из важнейших антиоксидантных ферментативных систем в живых организмах является глутатионпероксидазная / глутатионредуктазная (ГП/ГР) система. Исследование ее функционирования в норме и при патологических состояниях представляет несомненный интерес в связи с распространенностью свободнорадикальных заболеваний, к числу которых могут быть отнесены повреждения печени различной этиологии, в том числе вызванные токсическим

действием ксенобиотиков или эндогенных соединений в чрезмерно высоких концентрациях, например, тиреоидных гормонов (ТГ) [1,2,3]. Для изучения физико-химических параметров каталитического действия ферментов необходимо получение их в высокоочищенном состоянии. В современной биохимии наиболее широко используемыми в процессе очистки ферментов методами являются различные виды хроматографии [4]. В связи с вышесказанным целью данной работы было получение очищенных ферментных препаратов ГП и ГР из ткани печени крыс с помощью хроматографических методов и исследование некоторых каталитических свойств данных ферментов в контроле, при развитии экспериментального токсического гепатита (ЭТГ) и гипертиреоза (ЭГТ).

Теоретическая часть

Глутатионпероксидаза (ГП; КФ 1.11.1.9.) катализирует реакцию детоксикации органических и неорганических пероксидов без образования свободных радикалов, используя в качестве донора водорода восстановленный глутатион (GSH). Активность ГП существенно зависит от концентрации данного субстрата и, следовательно, от активности глутатионредуктазы (ГР; КФ 1.6.4.2), восстанавливающей окисленный глутатион (GSSG) с использованием НАДФН [5].

Ряд патологий сопровождается дисбалансом между активностью антиоксидантных систем, способных обезвреживать активные формы кислорода (АФК) и продукты их взаимодействия с биомолекулами, и скоростью образования этих метаболитов [6,7]. Так, при острой интоксикации хлорированными углеводородами у человека развивается клиническая картина тяжелого токсического гепатоза, значительную роль в возникновении которого играет усиление свободнорадикальных процессов [1]. Имеются также сведения, что окислительный стресс развивается при больших концентрациях ТГ в организме [2,3]. Среди многосистемных сдвигов, возникающих под действием избытка ТГ, выделяют и поражения печени (тиреотоксический гепатоз) [8].

Эксперимент

В качестве объекта исследования использовали самцов белых лабораторных крыс массой 150-200 г. Для моделирования экспериментального токсического гепатита использовали четыреххлористый углерод, являющийся органоспецифичным токсином, обладающим гепатотропным действием. CCl_4 вводили животным однократно перорально после суточной пищевой депривации в дозе 0,064 мл на 100 г веса животного в виде раствора в вазелиновом масле [9]. Печень забирали на 4-е сутки, когда наблюдался максимальный цитоллиз гепатоцитов. Для индуцирования экспериментального гипертиреоза животным вводили внутривенно трийодтиронин в дозе 100 мкг/100 г массы тела в виде раствора в 0,9% NaCl, трижды в течение 6 дней [10]. Печень забирали на 7-е сутки после начала эксперимента.

О развитии патологических изменений в печени свидетельствовали активности маркерных ферментов (аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы). При ЭТГ и ЭГТ происходило возрастание данных параметров в сыворотке крови животных, что являлось следствием цитолиза гепатоцитов [11,12].

Гомогенат печени получали путем гомогенизации навески ткани в фарфоровой ступке в 4-х кратном объеме охлажденной среды выделения (50 мМ трис-НСl-буфер (рН 7,8), содержащий 1 мМ ЭДТА, 1% β-меркаптоэтанол), фильтрования полученной суспензии через слой капрона с квадратными ячейками (0,1 мм) и центрифугирования при 5000g в течение 10 мин для отделения неразрушенных клеточных элементов и ядер.

Активность ГП и ГР определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм. Измерение активности ГП проводили с помощью сопряженной ферментативной реакции в среде спектрофотометрирования следующего состава: 50 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,4), содержащий 1 мМ ЭДТА, 0,12 мМ НАДФН, 0,85 мМ восстановленного глутатиона, 0,37 мМ H₂O₂, 1 ед/мл ГР. Контрольная проба не содержала восстановленный глутатион. Определение активности ГР проводили в среде спектрофотометрирования, содержащей 50 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,4), 1 мМ ЭДТА, 0,16 мМ НАДФН и 0,8 мМ окисленного глутатиона. В контроль не вносили анализируемую пробу. Реакцию начинали добавлением ферментного препарата. За единицу ферментативной активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль продукта реакции или превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин при температуре +25°C.

Очистку ГП из печени крыс осуществляли с помощью гель-фильтрации через сефадекс G-25 и ионообменной хроматографии через ДЭАЭ-целлюлозу. В случае ГР перед нанесением ферментного препарата на колонку с сефадексом G-25 его подвергали фракционированию сульфатом аммония. При этом выделяли белковую фракцию, выпадающую в осадок в пределах насыщения (NH₄)₂SO₄ 40–70%.

При проведении гель-фильтрации через сефадекс G-25 (Fine, 1,7×20 см) ферментный препарат наносили на колонку в количестве не более 20-25 % от ее объема. В качестве элюирующей среды для ГП и ГР использовали 0,05 М трис-НСl-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.

Для разделения белков по заряду использовали ионообменную хроматографию на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (0,8×13 см). На данной стадии очистки использовали среду элюции того же состава, что и на предыдущей. Скорость элюции составляла 20-25 мл/час. Каждую фракцию объемом 1,5 мл анализировали на присутствие ферментативной активности и на содержание белка.

Общее количество белка в пробах определяли по методу Лоури [13]. Все процедуры выделения и очистки фермента проводили при температуре 0-4°C. Опыты проводили в 3-4-кратной биологической повторности, аналитические определения в каждой пробе – в 2-х повторностях. Полученные данные обрабатывали с использованием статистических критериев [14]. Обсуждаются статистически достоверные различия при p<0,05.

Обсуждение результатов

Показано, что при развитии патологических состояний происходит повышение активности антиоксидантных ферментов ГП и ГР по сравнению с контролем, что может иметь важное адаптивное значение при интенсификации свободнорадикальных процессов. Очистку ГП и ГР из печени крыс проводили по

вышеописанной схеме. Результаты очистки ферментов представлены в таблицах 1 и 2.

Белковую смесь освобождали от низкомолекулярных примесей с помощью гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25. При очистке ГР эту процедуру проводили после фракционирования сульфатом аммония. В этом случае оценку эффективности обессоливания ферментного препарата проводили с помощью реактива Несслера, являющегося качественным реагентом на $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [4]. Во фракциях, относящихся к пику активности ГР, сульфат аммония не был обнаружен. Необходимо отметить, что в ходе гель-фильтрации на сефадексе G-25 происходило значительное размывание растворов изучаемых ферментов. На этой стадии также было отмечено возрастание степени очистки как ГП, так и ГР. Это связано с тем, что после данного этапа для дальнейшей очистки использовались фракции, обладающие максимальной ферментативной активностью. При этом часть фракций, содержащих белок, отбрасывалась, что, очевидно, приводило к увеличению удельной активности ГП и ГР. Также, нельзя исключить, что в процессе гель-фильтрации через сефадекс G-25 происходило удаление низкомолекулярных примесей, способных подавлять активность ферментов.

Свободные от низкомолекулярных примесей ферментные препараты наносили на ДЭАЭ-целлюлозу, после чего колонку промывали 20 мл среды элюции для десорбции несвязанных белков. Элюцию ГП и ГР с ионообменника проводили путем ступенчатого повышения концентрации KCl в среде элюции. Для десорбции как ГП, так и ГР с колонки наиболее эффективным оказалось повышение концентрации KCl в среде элюции с 50 до 100 мМ. Промывание колонки 50 мМ KCl позволяло удалить сопутствующие белки. В целом ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе позволяла значительно повысить чистоту ферментного препарата (таблицы 1 и 2). Совокупность выше описанных процедур позволила получить частично очищенные препараты ГП и ГР из печени крыс. Так, ГП была очищена в 39,2; 44,1 и 31,5 раза соответственно из ткани животных контрольной группы, печени, подвергшейся действию гепатотоксина и гормонов щитовидной железы в высоких концентрациях. В этих случаях выход оказался достаточно высоким – 40,2; 29,1 и 30,1%. Ферментный препарат ГР из печени крыс был получен со степенью очистки 56,4; 48,8 и 62,3 в контроле, при ЭТГ и ЭГТ. Выход при этом составил 45,3; 29,2 и 35,9% соответственно.

Таблица 1. Очистка глутатионпероксидазы из печени крыс контрольной группы, животных с токсическим гепатитом и экспериментальным гипертиреозом

Стадия очистки	Условия опыта	Общая активность, Е	Количество белка, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
гомогенат	контроль	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±0.001	100	1
	ЭГТ	4.36±0.19	396.36±18.52	0.011±0.001	100	1
хроматография на сефадексе G-25	контроль	2.38±0.07	122.00±2.81	0.019±0.001	90.2	1.46
	ЭТГ	7.94±0.26	103.00± 4.12	0.077±0.002	85.0	2.20
	ЭГТ	4.19±0.16	208.42±9.44	0.020±0.001	96.1	1.82
хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	контроль	1.06±0.03	2.08±0.08	0.510±0.015	40.2	39.23
	ЭТГ	2.72±0.11	1.76±0.07	1.545±0.052	29.1	44.14
	ЭГТ	1.31±0.06	3.79±0.17	0.346±0.014	30.1	31.46

Очищенные ферментные препараты ГП и ГР из гепатоцитов крысы были использованы для изучения некоторых каталитических параметров функционирования фермента. Согласно результатам исследования, кинетика ферментативных реакций, катализируемых ГП и ГР, подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен. Значения K_m , определенные методом двойных обратных координат, для ГП и ГР из печени крыс исследуемых групп представлены в таблицах 3 и 4. Выявлено, что при ЭТГ происходит снижение K_m ГП к GSH в 3 раза, при ЭГТ – в 1,7 раза. Для H_2O_2 величина K_m после введения гепатотоксина снижалась на 11%, при ЭГТ отмечалась лишь тенденция к изменению данного параметра. Увеличение сродства ГП к субстратам при поражении печени, вероятно, связано с изменением содержания данных метаболитов в клетке при окислительном стрессе и может выступать важным аспектом в регуляции активности фермента. Для ГР в условиях патологических состояний было отмечено повышение значений K_m по отношению к субстратам (таблица 4) и, следовательно, снижение сродства фермента к ним. Это может быть объяснено с точки зрения накопления при патологии GSSG и проявления эффекта субстратного ингибирования. В то же время отношение V_{max}/K_m , отражающее в большей степени эффективность функционирования фермента, возрастает при патологиях, сопряженных с окислительным стрессом, что может сказываться на увеличении активности ГР по сравнению с контролем.

Таблица 2. Очистка глутатионредуктазы из печени крыс контрольной группы, животных с токсическим гепатитом и экспериментальным гипертиреозом

Стадия очистки	Условия опыта	Общая активность, Е	Количество белка, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
гомогенат	контроль	16.50±0.68	243.21±9.66	0.068±0.003	100	1
	ЭТГ	39.21±1.79	276.12±9.98	0.142±0.006	100	1
	ЭГТ	25.14±1.32	386.76±18.15	0.065±0.003	100	1
фракционирование $(NH_4)_2SO_4$	контроль	15.08±0.56	187.69±9.85	0.080±0.004	91.4	1.18
	ЭТГ	37.70±1.67	164.87±8.18	0.229±0.009	96.1	1.61
	ЭГТ	24.35±1.19	196.37±8.9	0.124±0.006	96.9	1.91
хроматография на сефадексе G-25	контроль	14.15±0.49	108.85±5.77	0.130±0.006	85.8	1.91
	ЭТГ	33.62±1.55	104.74±5.48	0.321±0.014	85.7	2.26
	ЭГТ	22.08±1.01	132.22±5.18	0.167±0.008	87.8	2.57
хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	контроль	7.48±0.29	1.95±0.08	3.836±0.167	45.3	56.41
	ЭТГ	11.43±0.49	1.65±0.06	6.928±0.315	29.2	48.79
	ЭГТ	9.03±0.40	2.23±0.09	4.05±0.17	35.9	62.31

Таблица 3. Значения K_m глутатионпероксидазы из печени крыс исследуемых групп

Экспериментальная группа	Значения K_m , мМ	
	GSH	H_2O_2
Контроль	0.033±0.002	0.208±0.010
ЭТГ	0.011±0.001	0.185±0.009
ЭГТ	0.019±0.001	0.196±0.008

Таблица 4. Значения K_M и V_{max}/K_M глутатионредуктазы из печени крыс исследуемых групп

Экспериментальная группа	Значения K_M , мМ		Значения V_{max}/K_M	
	GSSG	НАДФН	GSSG	НАДФН
Контроль	0.23±0.009	0.208±0.010	3.95±0.17	2.29±0.11
ЭТГ	0.71±0.025	1.731±0.079	7.04±0.29	4.81±0.21
ЭГТ	0.59±0.024	1.273±0.061	5.82±0.25	3.68±0.17

Проведено также исследование зависимости скорости реакций, катализируемых ГП и ГР, от концентрации ионов H^+ в контроле и при патологических состояниях. Выявлено, что ГП из печени интактных животных проявляет максимальную ферментативную активность в диапазоне рН=7,24-7,62. При этом оптимальным значением для проявления ферментативной активности ГП является значение рН 7,42. Уменьшение рН до 6,82 или увеличение его до 8,22 приводит к резкому снижению активности фермента, так как ГП становится нестабильной. При патологии наблюдается смещение рН оптимума в более кислую сторону – при ЭТГ он составляет 7,24, при ЭГТ – 7,22, что, очевидно, имеет значение для функционирования фермента в условиях ацидоза, сопровождающего развитие окислительного стресса при свободнорадикальных патологиях. ГР из печени животных контрольной группы проявляет максимальную активность в диапазоне рН 7,22-7,58. Оптимальным значением рН для функционирования фермента в контроле является 7,42. При ЭТГ и ЭГТ не было обнаружено значительных изменений данного параметра.

В связи со значительной ролью ионов магния во многих внутриклеточных процессах, в том числе в активации многих ферментов, нами было проведено исследование их влияния на скорость протекания реакций, катализируемых ГП и ГР, в контроле и при развитии окислительного стресса. Показано, что ионы Mg^{2+} значительно повышают активность ГП и ГР из печени животных всех экспериментальных групп. Так, при оптимальной концентрации ионов Mg^{2+} в среде спектрофотометрирования (1 мМ в контроле, 0,3 мМ при ЭТГ, 0,5 мМ при ЭГТ) активность ГП возрастает в 1,6, 1,3 и 1,4 раза соответственно. Для ГР было обнаружено более чем 2-кратное увеличение ферментативной активности при 0,1 мМ, 0,3 мМ и 0,4 мМ концентрации ионов Mg^{2+} соответственно. Увеличение концентрации ионов данного металла ведет к снижению степени активирующего воздействия на ГР.

С использованием очищенных ферментных препаратов в данной работе также было проведено исследование влияния цитрата на активность ГП и ГР из печени крыс экспериментальных групп. Данное соединение может играть важную адаптивную роль при интенсификации свободнорадикальных процессов в организме вследствие проявления антиоксидантных свойств -способности хелатировать ионы металлов переменной валентности, которые могут выступать в роли прооксидантов. В литературе имеются данные об увеличении его концентрации при свободнорадикальных патологиях [15,16]. В ходе исследования было показано, что цитрат оказывает различное влияние на ГП из печени крыс в контроле и при развитии патологии. Так, данный метаболит практически не влияет на активность ГП из печени интактных крыс. При ЭТГ и ЭГТ имеет место активирование ферментативной активности, особенно заметно выраженное при концентрациях цитрата выше 0,5 мМ. На ГР из печени крыс контрольной группы данное соединение в концентрациях до 0,1 мМ оказывает тормозящее действие, при повышении концентрации метаболита в диапазоне до 0,4 мМ имеет место повышение

активности фермента. Выявлено, что на ГР из патологически измененной ткани цитрат оказывает активирующее влияние в концентрациях до 0,8 мМ, а затем начинает проявляться тормозящий эффект (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о возможности регуляции активности ГП и ГР из гепатоцитов крыс в норме и при патологии с помощью цитрата, который является одним из наиболее важных соединений, участвующих в метаболизме живой клетки.

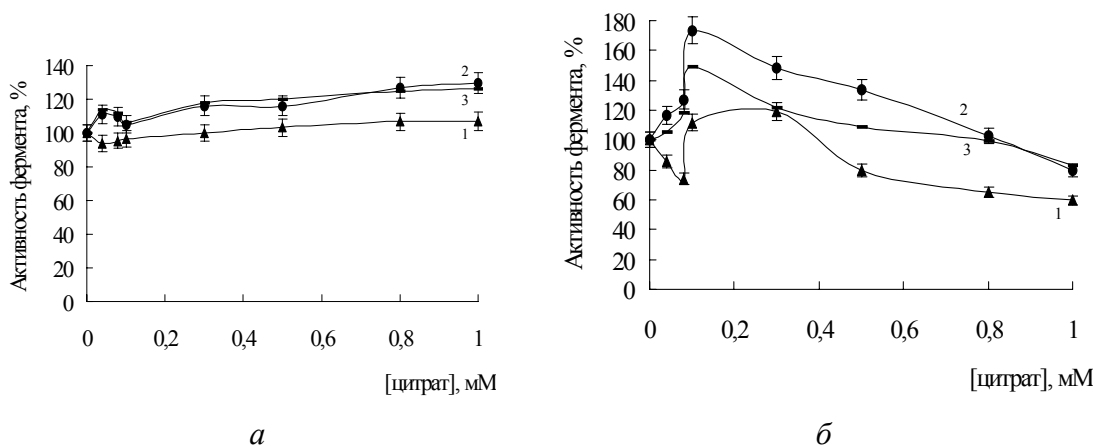


Рис. 1. Влияние цитрата на активность ГП (а) и ГР (б) из печени контрольных животных (1), крыс с ЭТГ (2) и ЭТГ (3).

Заключение

Таким образом, с помощью комбинирования хроматографических методов были получены в очищенном состоянии ГП и ГР из печени крыс, что позволило исследовать некоторые каталитические параметры функционирования данных ферментов.

Список литературы

1. Lee W.M. Drug-induced hepatotoxicity // N. Eng. J. Med. 1995. V. 333. №17. P. 1118-1127.
2. Fernandez V., Barrientos X., Kipreos K. Superoxide radical generation, NADPH oxidase activity, and cytochrome P-450 content of rat liver microsomal fractions in an experimental hyperthyroid state: relation to lipid peroxidation // Endocrinology. 1985. V. 117. P. 496-501.
3. Asayama K., Dobashi K., Hayashibe H. Lipid peroxidation and free radical scavengers in thyroid dysfunction in the rat: a possible mechanism of injury to heart and skeletal muscle in hyperthyroidism // Endocrinology. 1987. V. 121. №6. P. 2112-2118.
4. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М. Высш. шк. 1980. 272 с.
5. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Биологическая роль глутатиона // Успехи современной биологии. 1990. Т. 110. №1. С. 20.
6. Осипов А.Н., Азизова О.А., Владимиров Ю.А. Активные формы кислорода и их роль в организме // Успехи биологической химии. 1990. Т. 31. № 2. С. 180-208.

7. Попова Т.Н., Пашков А.Н., Семенихина А.В., Попов С.С., Рахманова Т.И. Свободнорадикальные процессы в биосистемах. Старый Оскол: Кириллица, 2008. 192 с.
8. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Фадеев В.В. Эндокринология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 432 с.
9. Сидорова В.Ф., Рябинина З.А., Лейкина Е.М. Регенерация печени у млекопитающих. М.: Медицина, 1966. 240 с.
10. Fernandez V., Simizu K., Barros S.B.M. Effects of hyperthyroidism on rat liver glutathione metabolism: Related enzymes' activities, efflux, and turnover // *Endocrinology*. 1991. V.129. P.85–91.
11. Попов С.С., Пашков А.Н., Попова Т.Н., Семенихина А.В., Рахманова Т.И. Мелатонин как фактор коррекции свободнорадикального окисления при токсическом поражении печени у крыс // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2007. Т. 70. №1. С. 48-51.
12. Попов С.С., Пашков А.Н., Попова Т.Н., Золоедов В.И., Рахманова Т.И. Оксидативный статус и содержание цитрата в тканях крыс при экспериментальном гипертиреозе и действии мелатонина // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2007. №8. С. 170-173.
13. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265-275.
14. Ллойд Э., Ледерман У. Справочник по прикладной статистике. М.: Финансы и статистика, 1990. 525 с.
15. Freminet A. Carbohydrate and acid metabolism during acute hypoxia in rats blood and heart metabolites // *Comp. Biochem. and Physiol.* 1981. V. 70. №3. P. 427–430.
16. Rafalowska U., Erecinska M., Chance B. The effect of aspartate on citrate metabolism in the cytosolic fraction of brain under conditions of normoxia, hypoxia and anesthesia // *J. Neurochem.* 1975. V.25. №4. P.497-501.

Сафонова Ольга Анатольевна – к.б.н., ассистент кафедры медицинской биохимии и микробиологии биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета, Воронеж, тел. 8(473) 2208278

Шульгин Константин Константинович – к.б.н., ассистент кафедры медицинской биохимии и микробиологии биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета, Воронеж, тел. 8(473) 2208278

Агарков Александр Алексеевич – к.б.н., ассистент кафедры медицинской биохимии и микробиологии биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета, Воронеж, тел. 8(473) 2208278

Попова Татьяна Николаевна – проф., д.б.н., зав. кафедрой медицинской биохимии и микробиологии биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета, Воронеж

Саиди Лайла – аспирант кафедры медицинской биохимии и микробиологии биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета, Воронеж

Safonova Olga A. – Dr. of Biology, the Assistant of the Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Biology and Soil Science Faculty of Voronezh State University, Voronezh, e-mail: safonova@bio.vsu.ru

Shulgin Konstantin K. – Dr. of Biology, the Assistant of the Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Biology and Soil Science Faculty of Voronezh State University, Voronezh, e-mail: kkshulgin@mail.ru

Agarkov Alexander A. – Dr. of Biology, the Assistant of the Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Biology and Soil Science Faculty of Voronezh State University, Voronezh

Popova Tatyana N. – Dr. of Biology, Prof., the Head of the Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Biology and Soil Science Faculty, Voronezh State University, Voronezh

Saidi Laila – the Post-graduate Student of the Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Biology and Soil Science Faculty of Voronezh State University, Voronezh