



УДК 577.152+577.17: 616.36.002

Применение методов хроматографии для очистки НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы из печени крыс в норме, при введении фактора некроза опухоли α и действии тиоктовой кислоты

Цветикова Л.Н., Попова Т.Н.

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Аннотация

НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа (КФ 1.1.1.42; НАДФ-ИДГ) была очищена из печени крыс в норме, при введении фактора некроза опухоли α и действии тиоктовой кислоты на фоне развития апоптоза, с помощью таких методов, как фракционирование сульфатом аммония, гель-фильтрация через колонку с сефадексом G-25 и Тойоперл HW-65, ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. При этом были получены ферментные препараты с удельной активностью 8,6; 10,7 и 9,4 Е/мг белка соответственно. На очищенных препаратах исследовано влияние аденозинфосфатов на активность НАДФ-ИДГ в условиях нормы и эксперимента.

Ключевые слова: хроматография, очистка, печень крысы, апоптоз, НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа, тиоктовая кислота

NADP - isocitrate dehydrogenase (E.C. 1.1.1.42, NADP-IDH) was purified from rat liver at norm conditions, after introduction of tumor necrosis factor α and thioctic acid action under apoptosis with help of such methods, as sedimentation by sulfat ammonium, gel-filtration through column with Sephadex G-25 and Toyopearl HW-65, ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose. At the result enzyme preparations of NADP-IDH with specific activity 8,6; 10,7 and 9,4 E/mg protein were obtained accordingly. The research of influence of adenosine phosphates on enzyme activity with using of purified preparations has been carried out.

Keywords: chromatography, purification, rat liver, apoptosis, NADP- isocitrate dehydrogenase, thioctic acid

Введение

Одним из универсальных факторов повреждения печени является провоспалительный цитокин - фактор некроза опухоли- α (ФНО- α), который, вырабатываясь в повышенных количествах, вызывает апоптоз гепатоцитов [1]. Инициация реакций, приводящих к программированной гибели клеток, сопряжена с развитием оксидативного стресса (ОС) и во многом зависит от антиоксидантного потенциала клетки.

В связи с этим вызывает интерес НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа (КФ 1.1.1.42; НАДФ-ИДГ), так как в ходе реакции, катализируемой данным ферментом, происходит образование НАДФН, необходимого для нормального

функционирования глутатионредуктазной/ глутатионпероксидазной (ГР/ГП) ферментной антиоксидантной системы. Рядом авторов проводились исследования влияния различных антиоксидантов на протекание свободнорадикальных процессов при патологических изменениях печени. Так, имеются сведения, что тиоктовая кислота (ТК) — естественный клеточный метаболит, содержащийся во многих органах и тканях человека, обладает гепатопротекторным действием [2].

Поскольку исследования, проводимые на высокоочищенных ферментных препаратах, позволяют наиболее адекватно оценить вклад той или иной ферментативной реакции в регуляцию и координацию метаболических процессов, то разработка эффективной методики очистки ферментов является важной частью процесса изучения физико-химических свойств и кинетических параметров действия биологических катализаторов.

Таким образом, целью настоящей работы явилось разработка метода очистки НАДФ-ИДГ и исследование участия аденозинфосфатов в регуляции активности данного фермента из печени крыс в норме, при введении ФНО- α и действии тиоктовой кислоты.

Теоретическая часть

В последние годы показано, что в развитии апоптоза ведущую роль играют активные формы кислорода (АФК) [3]. В тоже время установлено, что быстрое возрастание внутриклеточного уровня АФК в различных типах клеток может быть вызвано стимуляцией рецепторов ФНО- α . ФНО- α представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 17,4 кДа. Молекулы ФНО гомологичны Fas-лиганду, мембранным молекулам CD40, CD30, фактору роста нервов и образуют особое семейство белков [4]. ФНО- α проявляет многочисленные иммуномодулирующие и провоспалительные эффекты, подавляющее большинство из которых могут иметь фундаментальное значение в иммунопатологии многих заболеваний. Несмотря на очевидную взаимосвязь ОС с апоптозом, роль АФК в саморазрушении клеток и механизмы реализации цитотоксичности не ясны. Более того, нет однозначного ответа на вопрос: чем является ОС— следствием или индуктором функциональных изменений, сопровождающих развитие апоптоза. Однако, согласно современным представлениям ключевым механизмом развития многих видов заболеваний являются мембраноповреждающие процессы в организме. Известно, что при многих заболеваниях эффективным протектором является ТК. В организме ТК образует динамичную окислительно-восстановительную систему, которая участвует в переносе ацильных групп в составе многокомпонентных ферментных систем [5].

ТК играет важную роль коэнзима в пируватдегидрогеназном ферментном комплексе. Она участвует в окислительном декарбоксилировании пирувиноградной кислоты и кетокислот, регулирует процесс образования энергии в клетке, являясь незаменимым компонентом реакций углеводного, липидного обмена, метаболизма холестерина [6].

Антиоксидантный эффект ТК обусловлен наличием 2 тиоловых групп в молекуле, а также способностью связывать молекулы радикалов и свободное тканевое железо.

Благодаря своим свойствам восстанавливать запасы глутатиона, предотвращать повреждение митохондрий и гибель клеток, обусловленную воздействием ФНО, ТК нашла широкое применение в гастроэнтерологии, кардиологии, эндокринологии [1].

Изоцитратдегидрогеназа катализирует окислительное декарбоксилирование D,L — трео-Ds- изоцитрата (ИЦ) в 2-оксоглутарат (2-ОГ) [7]. Продукт реакции, катализируемой ИДГ, 2-ОГ, имеет важное значение в процессах образования аминокислот в реакциях переаминирования, и на уровне 2-ОГ, происходит пересечение основных путей углеродного и азотного обмена.

НАДФ-ИДГ присутствует во многих тканях, при этом, наибольшее ее содержание отмечается в сердце, печени и скелетной мускулатуре. В основном НАДФ-ИДГ находится в цитоплазме клетки (около 90 %) и лишь небольшое количество присутствует в митохондриях [8].

Считается, что для проявления активности НАДФ-ИДГ ключевое значение имеют следующие аминокислотные остатки: цистеин, метионин, глутамин, лизин [9]. Было показано, что в нативном ферменте две SH-группы, приходящиеся на одну субъединицу, легко доступны и несущественны для каталитической активности НАДФ-ИДГ, еще две SH-группы в активном центре полностью защищены субстратом (Mn-ИЦ) и существенны для проявления активности фермента. Предполагается, что остатки цистеина и глутаминовой кислоты ответственны за связывание комплекса [ИЦ - Mn^{2+}], тогда как метионин участвует в связывании НАДФН.

Для НАДФ-ИДГ из некоторых объектов было показано что фермент представляет собой диссоциирующую ферментную систему типа мономер -димер, в которой мономерная форма неактивна. Это характерно для НАДФ-ИДГ из сердца свиньи и печени быка [10].

Эксперимент

В качестве объекта исследования использовались самцы белых лабораторных крыс (*Rattus rattus* L.) массой 180-200 г, содержащиеся на стандартном режиме вивария. Для индукции апоптоза животным вводили актиномицин D внутривнутрибрюшинно в дозе 20мкг на кг веса животного, а затем через 20 минут вводили ФНО- α (1мкг/кг) [11]. ТК после индуцирования апоптоза вводили внутривнутрибрюшинно (16 мг/кг) [12], трехкратно, с интервалом 3 часа. Исследование протекторной функции ТК проводили через 12 часов после введения ФНО- α , что было связано с максимальным уровнем развития свободнорадикальных процессов и степени цитолиза гепатоцитов к этому времени [13].

Очистка НАДФ-ИДГ из печени интактных крыс и животных, которым вводили ФНО- α и ТК, включала ряд стадий:

1. Гомогенизацию материала проводили в среде выделения НАДФ-ИДГ следующего состава: 50 ммоль/л трис-HCl-буфер, pH 7,8, содержащий 1,5 ммоль/л ИЦ, 2 ммоль/л $MnCl_2$, 0,1 ммоль/л ЭДТА, 1% β - меркаптоэтанол (β -МКЭ). Гомогенат процеживали и центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин. Супернатант использовали для определения активности и последующей очистки НАДФ-ИДГ.

2. Фракционирование белков сульфатом аммония. Определение границ выделения НАДФ-ИДГ из белкового раствора проводили путем ступенчатого повышения концентрации $(NH_4)_2SO_4$ в смеси. Кристаллический сульфат аммония добавляли к гомогенату в количестве, соответствующем нижней границе насыщения (25% в условиях введения ФНО- α и действия ТК на фоне развития апоптоза и 35% - в норме). Смесь центрифугировали при 10000g в течение 10 мин. Затем к супернатанту добавляли соль в количестве, соответствующем верхнему пределу

насыщения (60% и 75% в условиях эксперимента и нормы соответственно). После центрифугирования при 15000g в течение 25 минут получали осадок, содержащий НАДФ-ИДГ. Полученный осадок растворяли в минимальном объеме исходной среды выделения. Затем белковую смесь освобождали от низкомолекулярных примесей с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-25.

3. Гель-фильтрация на сефадексе G-25. Сефадекс G-25 (Fine) применяли для освобождения ферментных препаратов от низкомолекулярных примесей. Перед использованием сефадекс замачивали в дистиллированной воде для набухания на 3-4 часа. Суспензию геля заливали в установленную строго вертикально колонку размером 1,4 x 20 см. Ферментные образцы наносили в количестве не более 20-25% от объема колонки. Скорость элюции составляла 25-30 мл в час, ее регулирование осуществлялось путем изменения гидростатического давления. В качестве элюирующей среды для НАДФ-ИДГ при гель-фильтрации на G-25 использовали 10 ммоль/л трис-HCl-буфер, pH 7.6-7,8, содержащий 1,5 ммоль/л ИЦ, 2 ммоль/л $MnCl_2$, 0,1 ммоль/л ЭДТА и 1% β -МКЭ. Каждую фракцию объемом 2-3 мл анализировали на присутствие ферментативной активности. Фракции, обладающие максимальной ферментативной активностью, объединяли и использовали для дальнейшей очистки.

4. Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. Для последующей очистки ИДГ применяли ионообменную хроматографию (ИОХ) на ДЭАЭ-целлюлозе. Перед использованием ионообменник подвергали специальной обработке: на каждый грамм сухого вещества добавляли 30 мл дистиллированной воды и оставляли набухать в течение 3-4 часов. Затем выдерживали в течение часа в 0,5N NaOH, потом в 0,5N HCl и снова в 0,5N NaOH. После каждой стадии обработки ионообменник отмывали на воронке Бюхнера дистиллированной водой до нейтрального значения pH промывных вод. ДЭАЭ-целлюлозу дегазировали, помещали в колонку (1,2 x 10 см) и уравнивали в течение 8-10 часов элюирующей средой. На колонку наносили ферментный препарат, предварительно освобожденный от низкомолекулярных примесей при помощи гель-фильтрации на сефадексе G-25. Среды элюции, используемые при ИОХ, имели тот же состав, что и при гель-фильтрации на сефадексе G-25. После сорбции белка на колонке проводили десорбцию фермента с помощью ступенчатого градиента KCl в той же среде элюции. Для десорбции НАДФ-ИДГ из печени здоровых крыс и животных, которым вводили ТК на фоне развития апоптоза использовали ступенчатый градиент KCl от 40 до 80 ммоль/л. Для очистки НАДФ-ИДГ из печени крыс с индуцированным апоптозом использовали ступенчатый градиент KCl от 20 до 50 ммоль/л. Скорость элюции составляла 20-25 мл/час. Фракции, относящиеся к пику активности, объединяли для дальнейшей очистки.

5. Гель-хроматография на Toyoperl HW-65. Приготовление колонки с Toyoperl HW-65 осуществляли следующим образом: методом декантации удаляли мелкие частицы, затем суспензию геля в рабочем буфере заливали в колонку 2 x 60 см. С помощью перистальтического насоса удаляли избыток буфера из колонки, при этом наблюдали за равномерным осаждением геля. Колонку уравнивали средой элюции, имеющей тот же состав, что и при гель-фильтрации на сефадексе G-25 и при ИОХ на ДЭАЭ-целлюлозе. На колонку наносили ферментный препарат объемом не более 1-3% от общего объема колонки. Элюцию проводили со скоростью 30 мл/час, каждую фракцию анализировали на присутствие ферментативной активности.

Активность ферментов определяли спектрофотометрически при длине 340 нм. За единицу ферментативной активности (Е) принимали количество фермента,

катализирующего образование 1 мкмоль продукта реакции за 1 мин при температуре 25°C. Среда для определения активности НАДФ-ИДГ имела следующий состав: 50 ммоль/л трис-НС1-буфер (рН 7,6-7,8), содержащий 1,5 ммоль/л изоцитрат, 2 ммоль/л $MnCl_2$, 0,25 ммоль/л НАДФ, 0,1 ммоль/л ЭДТА.

Общий белок определяли по методу Лоури.

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

Обсуждение результатов

Результаты очистки НАДФ-ИДГ из печени контрольных и экспериментальных групп крыс представлены в таблице 1. На начальных стадиях очистки с целью отделения низкомолекулярных примесей от белкового препарата, полученного после фракционирования сульфатом аммония, была использована гель-хроматография на сефадексе G-25. Хотя хроматография на данном носителе не позволяет осуществить разделение высокомолекулярных веществ, на этой стадии очистки нам удалось освободиться от $\approx 15\%$ белков. Это может быть объяснено тем, что для дальнейшей очистки нами использовались только фракции, обладающие наибольшей активностью фермента. Основное значение для отделения посторонних белков имели стадии ИОХ на ДЭАЭ-целлюлозе и гель-фильтрации на Тойоперл HW-65. Так, после ИОХ содержание белка по сравнению с гомогенатом снизилось в 40 раз в норме, в 33 и 30 раза при введении ФНО- α и ТК на фоне развития апоптоза соответственно. Десорбция НАДФ-ИДГ с колонки с ДЭАЭ-целлюлозой происходила при увеличении концентрации КС1 в среде элюции с 20 до 80 мМ (рис. 1). Следует отметить, что на данном этапе очистки ферментного препарата наблюдались изменения хроматографических свойств НАДФ-ИДГ, выделенной из печени крыс при введении ФНО- α , по сравнению с условиями нормы и действия ТК, а именно, происходило изменение границ градиента КС1 при патологии, что может быть следствием конформационных модификаций фермента при введении крысам цитокина. После заключительного этапа выделения фермента с использованием Тойоперл HW-65 степень очистки по белку составила 703; 587 и 564 раза в норме, при введении ФНО- α и ТК соответственно.

Таким образом, в результате 96,0-; 76,0- и 93,5-кратной очистки были получены ферментные препараты НАДФ-ИДГ из печени контрольных крыс и животных, которым вводили ФНО- α и ТК на фоне развития апоптоза с удельной активностью 8,6; 10,7 и 9,4 Е/мг белка и выходом 13,1; 12,1 и 15,7% соответственно (табл.1).

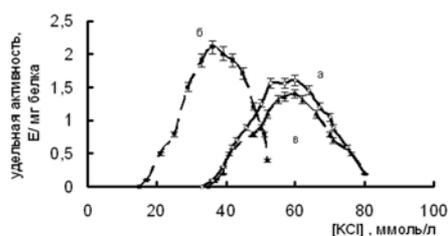


Рис.1. Десорбция НАДФ-ИДГ, выделенной из печени крыс в условиях нормы (а), при введении ФНО- α (б) и действии ТК на фоне апоптоза (в), с колонки ДЭАЭ-целлюлозы

Высокий выход фермента свидетельствует о том, что используемая комбинация хроматографических методов позволяет выделить чистый ферментный препарат с относительно небольшими потерями.

С использованием полученных гомогенных препаратов в настоящей работе было проведено исследование влияния АТФ, АДФ и АМФ на функционирование НАДФ-изоцитратдегидрогеназы из гепатоцитов крысы.

При 0,4 мМ концентрации АТФ активность НАДФ-ИДГ из печени интактных крыс уменьшается в 2,2 раза, а при введении ФНО- α в 1,2 раза по сравнению с первоначальным уровнем. При введении ТК на фоне развития апоптоза наблюдается усиление ингибирующего действия АТФ по сравнению с данными при развитии апоптоза, так активность НАДФ-ИДГ из печени крыс в условиях оксидативного стресса и действия ТК на фоне апоптоза составляет 85% и 64% соответственно (рис. 2а).

АДФ также оказывает неравнозначный эффект на активность НАДФ-ИДГ, выделенной из печени крыс в условиях нормы, действия ФНО- α и ТК. Так, при 0,2 мМ концентрации АДФ активность данного фермента составила 98%, 110% и 86% соответственно. При увеличении концентрации АДФ в 4 раза происходит ингибирование фермента во всех исследованных группах, при этом активность данного фермента падает в условиях нормы, действия ФНО- α и ТК в 2,4; 1,5 и 1,3 раза соответственно (рис. 2б).

В диапазоне концентраций АМФ 0,1-0,6 мМ активность НАДФ-ИДГ возрастает под действием данного метаболита во всех экспериментальных группах. Так, при 0,3 мМ активность фермента составляет 134%, 114% и 120% в условиях контроля, индукции апоптоза и действия ТК соответственно. Следует отметить, что ТК усиливает действие АМФ на данный фермент по сравнению с патологией (рис. 2в).

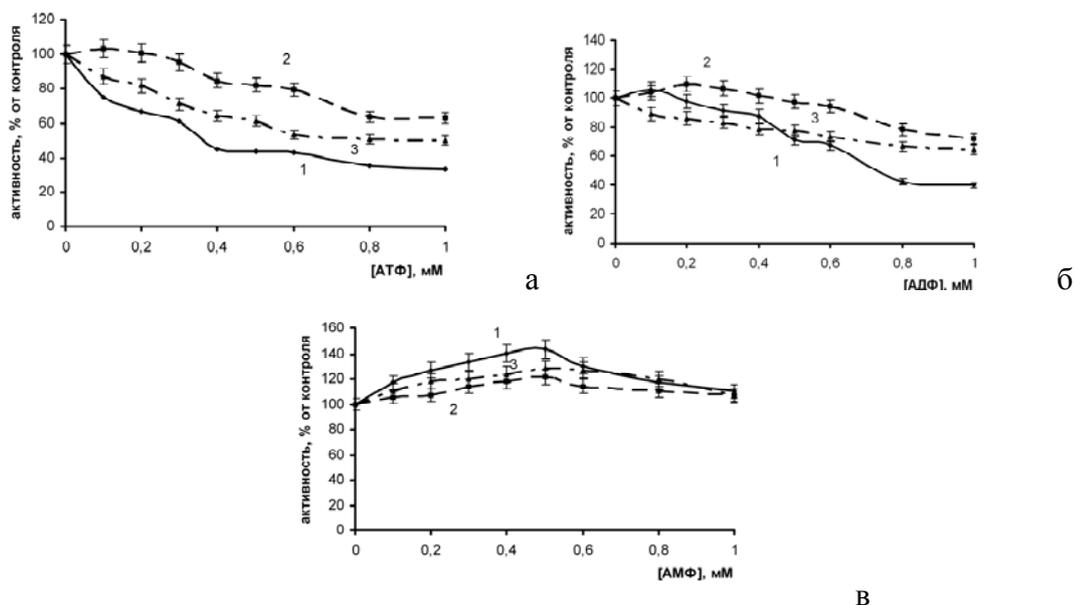


Рис. 2: Влияние АТФ (а), АДФ (б) и АМФ (в) на активность НАДФ-ИДГ из печени контрольных крыс(1), животных, подвергшихся введению ФНО- α (2) и крыс, которым вводили тиоктовую кислоту на фоне развития апоптоза (3)

Таблица 1. Очистка НАДФ - 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
Ионообменная 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 Toyoperl 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

Примечание: в таблицах 1-3 отличия от нормы достоверны ($p < 0.05$)

На основании полученных данных можно сделать вывод, что АТФ и АДФ оказывают ингибирующий эффект, а АМФ - активирующий эффект в условиях нормы и патологического состояния. Однако введение ТК способствовало усилению ингибирующего эффекта АТФ и АДФ по сравнению с данными при патологии. Вероятно, различие в действии аденозинфосфатов связано с особенностями регуляции НАДФ-ИДГ в условиях нормы и при введении ФНО- α . Это можно объяснить изменениями метаболизма клетки в условиях апоптоза. Действие ТК объясняется ее антиоксидантными свойствами, что способствует нормализации биохимических параметров на фоне развития апоптоза.

Заключение

Таким образом, с использованием разработанной схемы очистки фермента, включающей различные виды хроматографии, были получены высокоочищенные препараты НАДФ-ИД из печени крыс в условиях нормы, при введении ФНО- α и действии тиоктовой кислоты. Для НАДФ-ИДГ из печени животных исследованных групп выявлены различия в хроматографических свойствах и регуляции активности аденозинфосфатами.

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

Список литературы

1. Шульпекова Ю.О., Ивашкин В.Т. Применение тиоктовой кислоты в гастроэнтерологии // Российский медицинский журнал. 2000. Т. 8, №15-16. С. 125-138.
2. Оковитый С.В., Шуленин С.Н. Клиническая фармакология гепатопротекторов. СПб. 2006. 80 с.
3. Саприн А.Н., Калинина Е. В. Окислительный стресс и его роль в механизмах апоптоза и развития патологических процессов // Успехи биологической химии. 1999. Т. 39. С. 289-326
4. Zhang M., Tracey K.J. Tumor necrosis factor //The cytokine handbook, 3rd ed. New York. Academic press, 1998. 515 p.
5. Рахманова Т. И., Попова Т.Н. Исследование влияния различных доз тиоктовой кислоты на активность глутатионовой системы в печени крыс в норме и при экспериментальном токсическом гепатите // Вестник ВГУ. 2005. №2. С. 87-90.
6. Пальцев М. А. Молекулярная медицина и прогресс фундаментальных наук // Вестник Российской Академии Наук. 2002. Т. 72, №1. С. 13-21.
7. Попова Т.Н. Изоцитратдегидрогеназы: формы, локализация, свойства и регуляция // Биохимия. 1993. Т.58, №126. С. 1861-1879.
8. Bednar R.A., Colman R.F. Chemical modification aprobe of the structure and function of the subunits of DPN-dependent isocitrate dehydrogenase //J. Biol. Chem. 1982. V.257, № 19. P. 11734-11739

9. Popova T.N., Pinheiro de Carvalho M.A.A. Citrate and isocitrate in plant metabolism //Biochim. et Biophys. Acta. 1998. V.1364, №3. P.307-325.
10. H.Carlier M.F., Pantaloni D. NADF - linked isocitrate dehydrogenase from beef liver. Purification, quaternary structure and catalytic activity //Eur.J.Bio-chem. 1973.V.37, №4.P. 341-354.
11. Zhao Y., Li Sh., Childs E., Kuharsky K. and Yin X. Activation of pro-death Bcl-2 family proteins and mitochondria apoptosis pathway in tumor necrosis factor- α -induced liver injury // The J. of Biolog. Chem. 2001. T. 276, N. 29.P. 27432-27440.
12. Бустаманте Дж., Лодж Дж., Маркоччи Л. Метаболизм α -липоевой кислоты в печени при различных формах патологии // Международный медицинский журнал. 2001. № 2. С. 133-141.
13. Попов С.С., Пашков А.Н. Семенихина А.В., Рахманова Т. И., Попова Т.Н., Сущенко Е.А. Влияние мелатонина на параметры биоохемиллюминесценции в сыворотке крови при введении фактора некроза опухоли- α // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования, создание новых физиологически активных веществ: мат. 5-й научно-метод. конф, Воронеж. 2007. С. 382-384.

Цветикова Любовь Николаевна – аспирант кафедры медицинской биохимии и микробиологии Воронежского государственного университета, тел. 4732) 208-278

Tsvetikova Lyubov – postgraduate of biology and soil science faculty, department of medical biochemistry and microbiology, Voronezh state university, e-mail: tsvn@front.ru

Попова Татьяна Николаевна - д.б.н., проф., зав. кафедрой медицинской биохимии и микробиологии Воронежского государственного университета, тел. (4732) 208-278

Popova Tatiana N. - Doctor of biology, head of the department of medical biochemistry and microbiology, professor, Voronezh state university