

УДК 577.181+577.114

ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ МИКРО- И НАНОЧАСТИЦЫ С ДОКСОРУБИЦИНОМ

П.С. Аверин, А.В. Лопес де Гереню, Н.Г. Балабушевич

(кафедра химической энзимологии химического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова; e-mail: nbalab2008@gmail.com)

Исследованы микро- и наночастицы с доксорубицином, полученные путем послойной адсорбции декстрансульфата и хитозана на нерастворимом комплексе антибиотик–полианион с последующей обработкой ультразвуком. Изучено влияние молекулярной массы биополимеров, числа полиэлектролитных слоев, pH формирования на состав, физико-химические свойства частиц и эффективность включения доксорубицина. Проанализированы высвобождение доксорубицина и мукоадгезивные свойства полиэлектролитных частиц, определяющие возможность их использования.

Ключевые слова: доксорубицин, микрокапсулирование, послойная адсорбция биополиэлектролитов, хитозан, декстрансульфат.

На протяжении 30 лет антрациклиновый антибиотик доксорубицин (Докс) остается одним из наиболее часто применяемых противоопухолевых лекарственных средств [1]. Докс состоит из полициклического антрациклинового ядра и углеводного остатка даунозамина (рис. 1), а его противоопухолевый эффект обусловлен встраиванием в двойную спираль ДНК, что приводит к репликации и транскрипции, образованию одно- и двухцепочечных разрывов молекул ДНК, мутагенному и канцерогенному действию на клетки. Докс способен накапливаться как в пораженных, так и в здоровых клетках организма, поэтому многочисленные исследования направлены на разработку подходов, позволяющих увеличить избирательность его действия и время циркуляции в кровотоке [2]. Наряду с включением Докс в липосомы, мицеллы и гидрогели, ковалентной и нековалентной иммобилизацией на полимерах и т.д. в последние годы активно исследуют комплексобразование антибио-

тика с полиакриловой, полиглутаминовой и полиаспарагиновой кислотами, декстрансульфатом, а также микро- и микрокапсулирование с использованием хитозана и его производных (гликоль, гексаноил, олеил, сукциноил и т.д.) [1, 3–5].

Метод послойной адсорбции разноименно заряженных полиэлектролитов на коллоидных частицах разного состава и строения широко используют для капсулирования биологически активных веществ (БАВ) [6–9]. Основные достоинства этой иммобилизации – осуществление процесса в мягких условиях в водной среде и возможность создания препаратов, имеющих различное строение, соответствующее их назначению. Известны три основных подхода послойного микрокапсулирования [6]:

- 1) включение БАВ в готовые полиэлектролитные микрочастицы путем изменения проницаемости их стенок;
- 2) введение БАВ в коллоидную матрицу с последующей адсорбцией полиэлектролитов;
- 3) использование БАВ в качестве полиэлектролитов при построении мультислоев.

В настоящее время продемонстрировано эффективное противоопухолевое действие Докс, капсулированного в сферические микрочастицы, полученные с помощью первого подхода [10–12] и второго подхода с использованием биоразлагаемых матриц [13]. При отсутствии строгих требований целевой доставки к форме и размеру полиэлектролитных микрочастиц нерастворимые комплексы БАВ (преимущественно белков) с декстрансульфатом признаны универсальными матрицами для адсорбции полиэлектролитов [14–

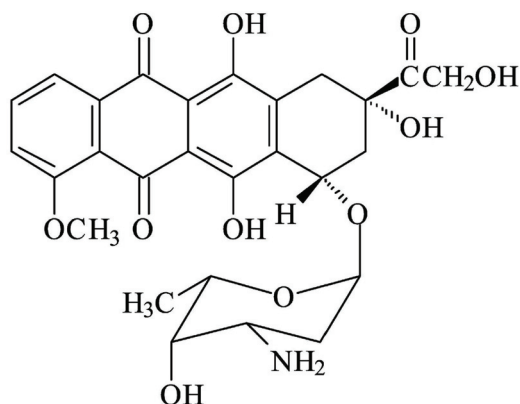


Рис. 1. Структурная формула доксорубицина

18]. Полиэлектrolитные частицы такого строения для Докс не описаны, но декстрансульфат в паре с противоположно заряженным хитозаном был успешно использован при капсулировании Докс методом комплексной коацервации [19–21].

В настоящей работе исследовано микрокапсулирование Докс послойной адсорбцией хитозана и декстрансульфата на нерастворимых комплексах Докс с декстрансульфатом.

Цель работы – изучение влияния молекулярной массы биополимеров и рН среды на физико-химические свойства и поведение полиэлектролитных микрочастиц с Докс, определяющие возможность их использования.

Методы исследования

Материалы. В работе использовали субстанцию гидрохлорида Докс («Dian Jiang Chong», Китай), хитозан со средней молекулярной массой 22, 150, 400, 600 кДа (Хит₂₂, Хит₁₅₀, Хит₄₀₀, Хит₆₀₀ со степенью дезацетилирования 98, 87, 85, 84% соответственно) и декстрансульфат натрия со средней молекулярной массой 5, 100 и 500 кДа (ДС₅, ДС₁₀₀, ДС₅₀₀). Хит₂₂ предоставлен центром «Биоинженерия» РАН, остальные полимеры производства фирмы «Fluka» (Швейцария). Муцин из свиного желудка, тип III («Sigma», США), содержащий 0,5–1,5% сиаловых кислот.

Получение частиц, содержащих доксорубин. Процесс получения вели в растворе 0,15 М NaCl с рН 3,0 или 5,0. Для получения нерастворимого комплекса (Докс–ДС) смешивали 0,75 мл раствора 0,28 мг/мл Докс и 0,75 мл раствора декстрансульфата (0,04–3,2 мг/мл). Смесь перемешивали 10 мин, центрифугировали 2 мин при 5000 g, надосадочный раствор отделяли и анализировали. К осадку (Докс–ДС) постадийно добавляли по 1,5 мл растворов 0,32 мг/мл хитозана или 0,32 мг/мл декстрансульфата. На каждой стадии адсорбции смесь перемешивали 10 мин с раствором полиэлектролита, центрифугировали 2 мин при 5000 g. Осадок дважды промывали раствором без полиэлектролита. По достижении необходимого числа стадий сорбции полиэлектролитов микрочастицы суспендировали в растворе 0,15 М NaCl и хранили в таком виде при 4°C или промывали дважды водой и высушивали лиофильно. При необходимости суспензию микрочастиц подвергали воздействию ультразвука в течение 10 мин с использованием гомогенизатора «Sonopuls HD 2070» («Bandelin», Германия).

Характеристика частиц, содержащих доксорубин. Морфологию и размер микрочастиц изучали с помощью световой оптической микро-

скопии («Opton III», «Carl Zeiss», Германия), конфокальной лазерной сканирующей микроскопии («Nikon Eclipse E800», Япония) и сканирующей электронной микроскопии («Hitachi S-520», Япония). Размер и ζ -потенциал частиц после обработки ультразвуком анализировали на установке «Zetasizer Nano ZS» («Malvern Instrument», Великобритания).

Концентрацию Докс в растворах определяли спектрофотометрически при длине волны 480 нм ($\epsilon = 12500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). При определении эффективности включения вычитали из количества Докс, взятого для капсулирования, количество Докс, содержащееся во всех надосадочных и промывных растворах, а полученную величину относили к исходному количеству антибиотика. При изучении состава полиэлектролитные частицы разрушали в растворе 1,5 М NaCl и определяли содержание Докс. При необходимости в разрушенных частицах анализировали с использованием метода Дюбуа [22] содержание декстрансульфата, а содержание хитозана рассчитывали с учетом содержания Докс и полианиона.

Изучение высвобождения доксорубина из полиэлектролитных частиц. Для изучения стабильности к отцентрифугированному осадку полиэлектролитных частиц добавляли раствор 0,5; 1,0; 1,5 или 2,5 М NaCl, а для изучения кинетики высвобождения – 0,1 М фосфатный буферный раствор (рН 7,4), содержащий 0,0027 М KCl и 0,137 М NaCl. При изучении стабильности смесь перемешивали 10 мин и определяли содержание Докс.

При анализе высвобождения суспензию перемешивали (100 об/мин, 37°C), отбирали через 1, 3, 6 и 24 ч аликвоты, которые центрифугировали (2 мин, 10000 g) и анализировали. Высвобождение Докс оценивали по отношению концентрации микрочастиц в супернатанте и суспензии.

Адсорбция муцина на микрочастицах. К высушенному осадку микрочастиц добавляли 1,5 мл раствора 0,25 мг/мл муцина. Суспензию инкубировали 1 ч (37°C, 100 об/мин). Отделяли супернатант центрифугированием (5 мин, 1500 g) и анализировали содержание муцина с помощью реагента Шиффа [15]. Адсорбцию муцина рассчитывали по разнице значений количества добавленного и оставшегося в супернатанте муцина.

Результаты и обсуждение

Основные стадии исследования и получения полиэлектролитных частиц (рис. 2):

1) образование нерастворимых микрокомплексов Докс и декстрансульфата (Докс–ДС);



Рис. 2. Схема получения полиэлектролитных микрочастиц на комплексе (Докс–ДС) путем послойной адсорбции хитозана (Хит) и декстрансульфата (ДС) и воздействия ультразвука (УЗ)

2) постадийная адсорбция на микрокомплексах противоположно заряженных хитозана и декстрансульфата;

3) ультразвуковая обработка частиц в целях измельчения.

При исследовании комплексообразования варьировали pH среды от 3,0 до 5,0 и соотношение ДС:Докс, учитывая, что каждый гликозидный остаток полианиона содержит 2,3 сульфатные группы ($6,4 \cdot 10^{-3}$ [SO₃⁻/г], а молекула антибиотика содержит одну аминогруппу ($pK_a = 8,6$), имеющую в выбранных условиях положительный заряд. Для отрицательно заряженных нерастворимых комплексов (Докс–ДС) наиболее высокая эффективность включения Докс (рис. 3) наблюдалась при соотношении [SO₃⁻]:[NH₃⁺], равном 4:1 и 8:1, возрастая в ряду ДС₅ < ДС₁₀₀ ≈ ДС₅₀₀ (табл. 1, № 1, № 3, № 7) и при понижении pH среды (табл. 1, № 7, № 9).

При получении микрочастиц наибольшие потери Докс наблюдались на стадии сорбции хитозана на (Докс–ДС), что связано с вытеснением антибиотика поликатионом (табл. 1, № 2, № 4, № 8 и № 9). Увеличение на этой стадии сорбции концентрации хитозана до достижения массового отношения [ДС]:[Хит] от 1:0,25 до 1:2 приводит к уменьшению эффективности включения Докс от 74 до 47%, а также к уменьшению размера частиц, вероятно, за счет возрастания их ζ-потенциала (табл. 2). При оптимизации этой стадии сорбции было выбрано массовое соотношение [ДС]:[Хит] = 1:1, при котором эффективность включения Докс составляет 55%, а ζ-потенциал частиц равен $+15 \pm 1$ мВ, что необходимо для последующей адсорбции полианиона. Влияние молекулярных масс полиэлектролитов на включение Докс при сорбции хитозана показано на рис. 4. Эффективность включения Докс увеличивается с ростом молекулярной массы декстрансульфата и при использовании хитозана средней молекулярной массы (Хит₁₅₀, Хит₄₀₀), что показано в табл. 1 (№ 2, № 4 и № 8).

В результате послойной адсорбции полиэлектролитов происходит перезарядка поверхности с отрицательной (при адсорбции декстрансульфа-

та) на положительную (при адсорбции хитозана) (табл. 1, № 3–6). Эффективность включения Докс с увеличением числа слоев полиэлектролитов уменьшается при pH 5,0 более интенсивно, чем при pH 3,0 (табл. 1, № 3–6 и № 9–12). С увеличением числа слоев полиэлектролитов содержание Докс в частицах уменьшается, а содержание декстрансульфата и хитозана зависит от строения частиц (табл. 3).

С использованием световой, конфокальной, сканирующей электронной микроскопии (рис. 5) и динамического лазерного светорассеяния (табл. 1) изучено влияние ультразвукового воздействия на частицы разного строения, имеющие неправильную форму и размер от 500 нм до 40 мкм. Микрочастицы, сформированные при более низком значении pH имели больший размер. При воздействии ультразвука не изменялся размер комплексов (Докс–ДС), составляющий около 1000 нм, мало изменялся размер частиц, сформированных при pH 3,0, а размер микрочастиц, сформированных при pH 5,0, уменьшался до 3000–4000 и 2000–2500 нм при использовании на последней стадии адсорбции декстрансульфата и хитозана соответственно (табл. 1). При воздействии ультразвука практически не изменялся ζ-потенциал

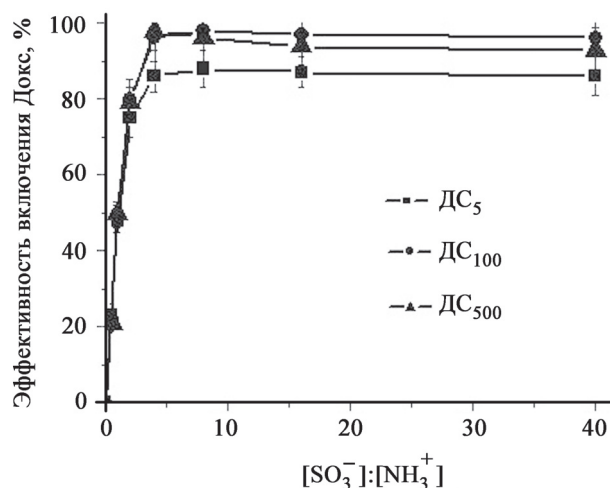


Рис. 3. Влияние молекулярной массы полианиона и зарядового соотношения ДС:Докс на включение Докс в нерастворимые комплексы с декстрансульфатом (Докс–ДС) при pH 5,0

Т а б л и ц а 1

Характеристика микрочастиц, полученных на комплексе (Докс–ДС) путем послойной адсорбции полиэлектролитов и воздействия ультразвука

Номер	Частица	pH	Эффективность включения Докс, %	ζ-потенциал, мВ	Средний размер, нм
1	(Докс–ДС ₅)	5	81±3	-19±5	1000±400
2	(Докс–ДС ₅)–Хит ₄₀₀	5	26±2	+6±2	1200±100
3	(Докс–ДС ₁₀₀)	5	92±5	-35±3	1300±400
4	(Докс–ДС ₁₀₀)–Хит ₄₀₀	5	55±3	+11±1	2200±600
5	(Докс–ДС ₁₀₀)–Хит ₄₀₀ –ДС ₁₀₀	5	48±3	-24±2	3500±900*
6	(Докс–ДС ₁₀₀)–Хит ₄₀₀ –ДС ₁₀₀ –Хит ₄₀₀	5	36±4	+7±2	2000±200
7	(Докс–ДС ₅₀₀)	5	87±5	-34±2	1100±400
8	(Докс–ДС ₅₀₀)–Хит ₄₀₀	5	65±5	+5±2	1300±400
9	(Докс–ДС ₅₀₀)	3	99±5	–	800±100
10	(Докс–ДС ₅₀₀)–Хит ₄₀₀	3	92±5	–	32000±3000*
11	(Докс–ДС ₅₀₀)–Хит ₄₀₀ –ДС ₅₀₀	3	92±4	–	9000±2000*
12	(Докс–ДС ₅₀₀)–Хит ₄₀₀ –ДС ₅₀₀ –Хит ₄₀₀	3	91±3	–	10000±2000*

*Данные световой микроскопии.

Т а б л и ц а 2

Влияние массового соотношения полиэлектролитов при получении частиц (Докс–ДС₁₀₀)–Хит₄₀₀ на включение антибиотика и свойства частиц

ДС:Хит, г/г	Эффективность включения Докс, %	ζ-потенциал частиц, мВ
0,5	47	17±1
1	55	15±1
2	62	9±2
4	74	-1,3±0,5

частиц. Частицы, полученные при pH 5,0 и обработанные ультразвуком, не изменяли своего размера в течение 3 месяцев наблюдения.

Анализ мукоадгезивных свойств и стабильности микрочастиц важен для прогнозирования путей их возможного использования. Для оценки мукоадгезивных свойств микрочастиц мы использовали хорошо зарекомендовавший себя метод инкубации частиц в растворах муцина [15, 16, 23]. Как известно, муцин является основным компонентом слизистых поверхностей и при физиологических значениях pH обладает отри-

цательным зарядом вследствие наличия фукозы и сиаловой кислоты на концах углеводных цепей [24]. Хитозан способен к образованию электростатических и водородных связей с муцином, поэтому микрочастицы, покрытые хитозаном с положительным поверхностным зарядом, обладают лучшими мукоадгезивными свойствами, чем частицы, имеющие на поверхности декстрансульфат (табл. 3).

Кинетика высвобождения Докс при физиологических значениях pH из микрочастиц, покрытых хитозаном, показана на рис. 6. Докс не выделялся

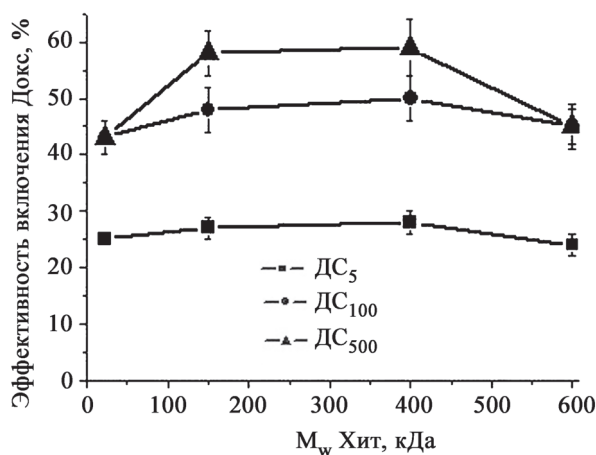


Рис. 4. Влияние молекулярных масс полиэлектролитов на включение Докс при адсорбции хитозана на комплекс (Докс–ДС) (ДС:Хит = 1:1(г/г), pH 5,0)

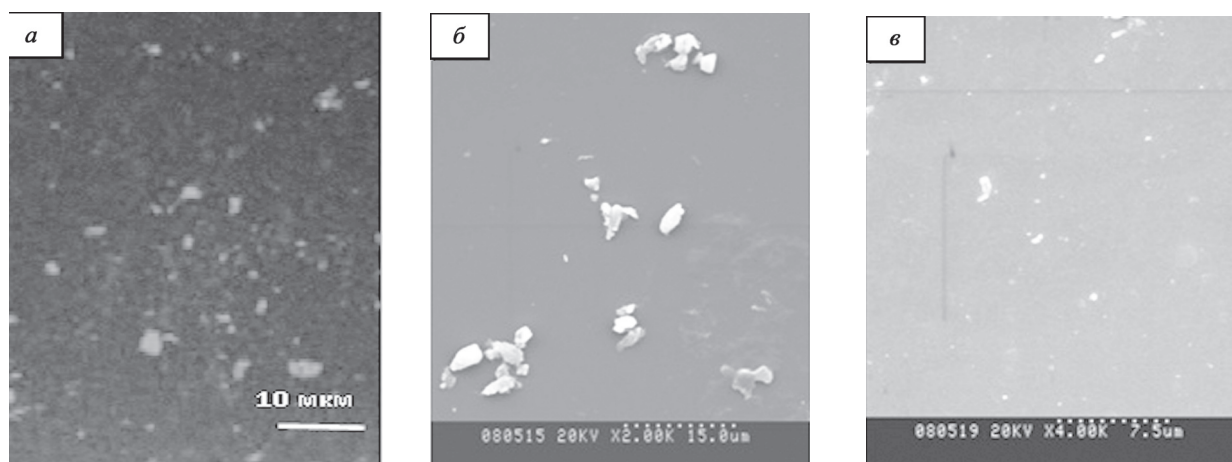


Рис. 5. Конфокальная лазерная сканирующая (а) и сканирующая электронная (б, в) микрофотографии частиц (ДС₁₀₀–Докс)–Хит₄₀₀ до (а, б) и после (в) воздействия ультразвука

Т а б л и ц а 3

Влияние строения полиэлектролитных частиц с Докс на связывание муцина

Частицы	Содержание, %			Адсорбция муцина, мкг/мг частиц
	Докс	Декстран–сульфат	Хитозан	
(Докс–ДС ₁₀₀)–Хит ₄₀₀	42±3	30±3	28	66±10
(Докс–ДС ₁₀₀)–Хит ₄₀₀ –ДС ₁₀₀	40±2	43±6	17	18±6
(Докс–ДС ₁₀₀)–Хит ₄₀₀ –ДС ₁₀₀ –Хит ₄₀₀	35±3	40±5	25	72±8

из частиц, полученных при pH 3,0, до 21 сут наблюдения. Из микрочастиц с двумя и четырьмя стадиями адсорбции, сформированных при pH 5,0, высвобождалось соответственно 9 и 12% Докс в течение 1 ч, 12 и 18% Докс в течение 24 ч. Полного высвобождение Докс из частиц удалось достичь

при увеличении концентрации NaCl выше 1,5 М (рис. 7), что было использовано для разрушения частиц при анализе их состава.

Таким образом, метод послойной адсорбции хитозана и декстрансульфата на нерастворимых агрегатах с полианионом, разработанный для

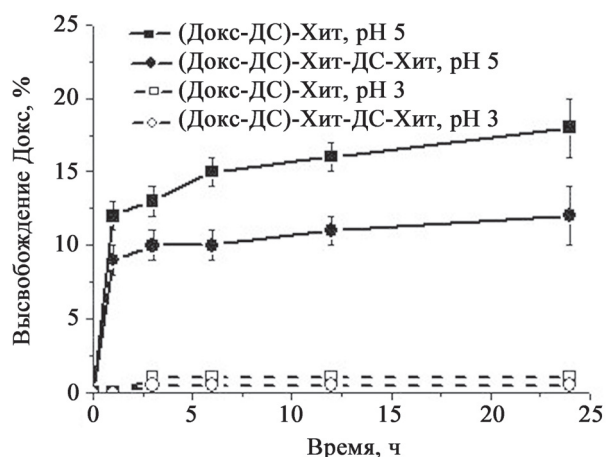


Рис. 6. Влияние pH формирования и строения частиц на кинетику высвобождения Докс при pH 7,4. При получении частиц использованы ДС₁₀₀ и Хит₄₀₀

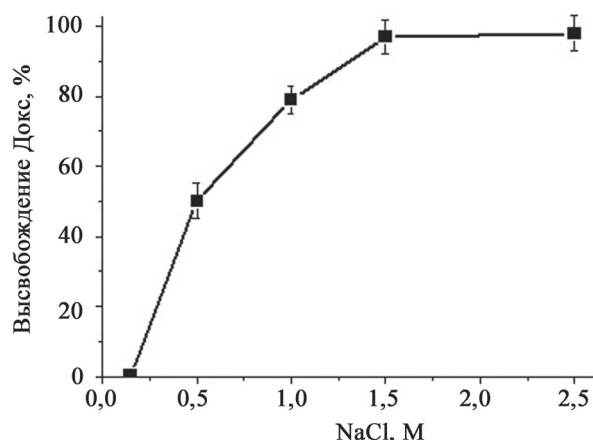


Рис. 7. Влияние ионной силы на высвобождение Докс из частиц (Докс-ДС₁₀₀)-Хит₄₀₀ (время инкубации 10 мин)

белков, показал пригодность для капсулирования Докс. Включение Докс зависит от pH формирования и строения частиц. Ультразвуковая обработка позволила измельчить частицы неправильной формы, сформированные при pH 5,0, до размера 2–3 мкм, что меньше размера частиц Докс, полученных из декстрансульфата и хитозана методом коацервации [19–21]. Мукоадгезивные свойства микрочастиц с Докс, покрытых хитозаном, лучше, чем свойства микрочастиц, покрытых декстрансульфатом, и сравнимы с аналогичными свойствами микрочастиц, полученных с использованием распылительной сушки и состоящих только из хитозана (50 мкг/мг) [25]. Вы-

свобождение Докс из частиц увеличивается как с ростом pH их формирования (что связано с образованием более прочного подиэлектролитного комплекса при низких значениях pH), так и с ростом числа слоев полимеров. Физико-химические свойства полиэлектролитных микрочастиц состава (Докс-ДС₁₀₀)-Хит₄₀₀ позволяют сделать предположение об их пригодности для доставки Докс в опухоли различной локализации (местно/регионально), например опухоли мочевого пузыря, стенки которого покрыты слоем муцина [26, 27], или простаты [28]. Однако лишь дальнейшие исследования *in vitro* и *in vivo* могут подтвердить или опровергнуть это предположение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tacar O., Sriamornsak P., Crispin R., Dass C.R. // Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2013. Vol. 65. P. 157.
2. Carvalho C., Santos R.X., Cardoso S., Correia S., Oliveira P.J., Santos M.S., Moreira P.I. // Curr. Med. Chem. 2009. Vol. 16. N 25. P. 3267.
3. Yousefpour P., Atyabi F., Farahani E.V., Sakhtianchi R., Dinarvand R. // Int. J. Nanomedicine. 2011. Vol. 6. P. 1487.
4. Tan M.L., Choong P.F.M., Dass C.R. // Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2009. Vol. 61. P. 131.
5. Sanyakamdhorn S., Agudelo D., Tajmir-Riahi H.A. // Biomacromol. 2013. Vol. 14. P. 557.
6. Балабушевич Н.Г., Изумрудов В.А., Ларионова Н.И. // Высокомолекул. соединения. Сер. А. 2012. Vol. 54. N 7. P. 1116.
7. Балабушевич Н.Г., Печенкин М.А., Лопес де Гереню А.В., Зоров И.Н., Михальчик Е.В., Ларионова Н.И. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2014. Т. 55. № 3. С. 158.
8. Balabushevich N.G., Larionova N.I. // J. Microencap. 2009. Vol. 26. N 7. P. 571.
9. Balabushevich N.G., Lebedeva O.V., Vinogradova O.I., Larionova N.I. // J. Drug Del. Scien. Techn. 2006. Vol. 16. N 4. P. 315.
10. Tao X., Chen H., Sun X.-J., Chen J.-F., Roa W.H. // Int. J. Pharm. 2007. Vol. 336. P. 376.
11. Zhao Q., Han B., Wang Z., Gao C., Peng C., Shen J. // Nanomedicine. 2007. Vol. 3. N 1. P. 63.
12. Gupta G.K., Kansal S., Misra P., Dube A., Mishra P.R. // PRAAPS Pharm. Sci. Tech. 2009. Vol. 10. N 4. P. 1343.
13. Deng Z.J., Morton S.W., Ben-Akiva E., Dreaden E.C., Shopsowitz K.E., Hammond P.T. // ACS Nano. 2013. Vol. 7. N 11. P. 9571.
14. Балабушевич Н.Г., Ларионова Н.И. // Биохимия. 2004. Т. 69. № 7. С. 930.
15. Балабушевич Н.Г., Печенкин М.А., Зоров И.Н., Шибанова Е.Д., Ларионова Н.И. // Биохимия. 2011. Т. 76. № 3. С. 400.
16. Balabushevich N.G., Pechenkin M.A., Shibanova E.D., Volodkin D.V., Mikhailchik E.V. // Macromol. Bioscience. 2013. Vol. 13. N 10. P. 1379.
17. Печенкин М.А., Балабушевич Н.Г., Зоров И.Н., Изумрудов В.А., Клячко Н.Л., Кабанов А.В.,

- Ларионова Н.И. // Хим.-фарм. журнал. 2013. Т. 47. № 1. С. 49.
18. Балабушевич Н.Г., Борзенкова Н.В., Изумрудов В.А., Ларионова Н.И., Безбородова О.А., Немцова Е.Р., Якубовская Р.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. № 2. С. 232.
19. Tan M.L., Friedhuber A.M., Dunstan D.E., Choong P.F.M., Dass C.R. // Biomaterials. 2010. Vol. 31. P. 541.
20. Delair T. // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2011. Vol. 78. P. 10.
21. Sijumon Kunjachan, Swati Gupta, Anil K. Dwivedi, Anuradha Dube, Manish K. // J. Microencaps. 2011. Vol. 28. N 4. P. 301.
22. Dubois M., Gilse A., Hamilton S.K., Robers P.A., Smith F. // Anal. Chem. 1956. Vol. 28. N 3. P. 350.
23. Киржанова Е.А., Хуторянский В.В., Балабушевич Н.Г., Харенко А.В., Демина Н.Б. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2014. № 3. С. 58.
24. Bansil R., Turner B.S. // Current Opinon in Colloidal & Interface Science. 2006. Vol. 11. P. 164.
25. He P., Davis S.S., Illum L. // Int. J. Pharm. 1998. Vol. 166. P. 75.
26. Treatment and management of bladder cancer. Ad. Lerner S.R., Schoenberg M.P., Sternberg C.N. Informa UK Ltd. 2008.
27. Gan Y., Wientjes M.G., Badalament R.A., Au J.L. // Clin. Cancer Res. 1996. Vol. 8. P. 1275.
28. Ortiz R., Au J.L., Lu Z., Gan Y., Wientjes M.G. // AAPS J. 2007. Vol. 9. N 2. P. 241.

Поступила в редакцию 01.12.15

POLYELECTROLYTE MICRO- AND NANOPARTICLES WITH DOXORUBICIN

P.S. Averin, A.V. Lopes de Gerenyu, N.G. Balabushevich

(Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Division of Chemical Enzymology)

Doxorubicin-containing micro- and nanoparticles, obtained by layer-by-layer adsorption of dextran sulphate and chitosan on insoluble antibiotic-polyanion complex and further sonication, were studied. The effect of biopolymer's molecular mass, number of polyelectrolyte layers and reaction medium pH on the content and physico-chemical properties of particles and the efficiency of doxorubicin incorporation was studied. The release of doxorubicin and mucoadhesive properties of polyelectrolyte particles were analysed in order to determine the possibility of their potential applications.

Key words: doxorubicin, microencapsulation, layer-by-layer biopolyelectrolyte adsorption, chitosan, dextran sulfate.

Сведения об авторах: *Аверин Петр Сергеевич* – студент химического факультета МГУ (nbalab2008@gmail.com); *Лопес де Гереню Анна Валентиновна* – студентка химического факультета МГУ (alopes@mail.ru); *Балабушевич Надежда Георгиевна* – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук, доцент, (nbalab2008@gmail.com).