

УДК 577.151.45

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ И ИЗМЕРЕНИЕ СОРБЦИИ БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА В СИСТЕМЕ ЖИВЫХ КЛЕТОК *Lactobacillus plantarum*

Д.А. Матолыгина, Е.Э. Осипова, С.А. Смирнов, Н.Г. Белогурова, Н.Л. Еремеев,
В.И. Тишков, А.В. Левашов, П.А. Левашов

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

Разработан метод турбидиметрического определения активности бактериолитических ферментов для субстрата живых клеток *Lactobacillus plantarum*. Описана методика измерения сорбции фермента на живых клетках в условиях определения активности. В качестве стандартного модельного фермента использован яичный куриный лизоцим. С помощью независимого подсчета КОЕ обоснована корректность расчетов кинетических параметров. Рассчитаны физико-химические параметры сорбции фермента на клетках и подтверждена правильность получаемых равновесных констант десорбции.

Ключевые слова: яичный куриный лизоцим, *Lactobacillus plantarum*, бактериолитическая активность.

В последние годы в мире возрос научный интерес к лактобактериям как одному из важнейших компонентов микрофлоры человека [1–3]. Эти микроорганизмы играют важную роль в защите человеческого организма от болезнетворных бактерий. Нестабильность симбиотических лактобактерий может приводить к различным заболеваниям [4, 5]. Кроме того, лактобактерии широко применяются в пищевой промышленности. Актуальным является вопрос об устойчивости лактобактерий в разных условиях [6–8]. Одним из факторов, влияющих на жизнеспособность клеток, является воздействие бактериолитических ферментов, способных разрушать бактериальную клетку. Несмотря на то, что лактобактерии изучают давно, до сих пор практически ничего не известно о процессе их ферментативного лизиса с физико-химической точки зрения. Каждый вид бактерий имеет свои особенности, поэтому не существует универсальных методик измерения их ферментативного лизиса. Данные по изучению активности бактериолитических ферментов, полученные на синтетических субстратах, не дают полноценного представления о лизисе живых клеток. На сегодняшний день изучение воздействия лизоцима на лактобактерии проводят методом подсчета числа живых клеток, который является неточным и трудоемким [9]. Кроме того, измерение активности на живых клетках сопряжено с рядом сложностей и в методическом плане, и в плане интерпретации результатов [10, 11]. Отдельной сложной методиче-

ской задачей при изучении бактериолитической активности на сложном полимерном субстрате (живой клетке) является определение характера и влияния на активность сорбции фермента на субстрате [12, 13]. В качестве субстрата мы выбрали клетки *Lactobacillus plantarum*, что обусловлено широким применением этого вида в медицине и отсутствием патогенных свойств. В качестве модельного бактериолитического фермента был взят яичный куриный лизоцим как наиболее изученный бактериолитический фермент. Цель данной работы – разработка простой и надежной методики измерения бактериолитической активности лизоцима в системе живых клеток *L. plantarum*, изучение влияния разных факторов на активность лизоцима и его адсорбцию на клетках *L. plantarum*.

Материалы и методы

В работе использованы следующие материалы: Tris, MES (ультра чистый, «Amresco», США); CH_3COOH («ч.», «Реахим», Россия); HCl («Germed», Германия); куриный яичный лизоцим (95% чистоты), препарат лиофилизированных бактерий *Micrococcus luteus* («Sigma Aldrich», США); Tween-85, NaCl , NaOH («ч.д.а.», «Merck», Германия); препарат лиофилизированных бактерий *L. plantarum* («Микроген», Россия). Из препарата лиофилизированных бактерий перед началом работы готовили суспензию (10 мл воды на одну ампулу). Свежевыращенные клетки *L. plantarum* получали пересевом из коммерческого препарата.

В качестве среды для культивирования использовали среду MRS (de Man-Rogose-Sharpe) pH 6,3 при 25°C [14] с модификацией состава (замена Tween-80 на Tween-85). Культуру клеток растили 36 ч при 37°C. В экспериментах по изучению активности лизоцима перед началом работы клетки однократно промывали буферным раствором следующим образом: суспензию центрифугировали на скорости 3500 об/мин в течение 4 мин, затем осадок клеток ресуспендировали со свежей порцией буферного раствора. Бактериолитическую активность и сорбцию фермента изучали при температуре 37°C. В качестве буферного раствора использовали 0,01 М Tris-MES-CH₃COOH с разными значениями pH и с разной концентрацией добавленного NaCl. Измерения проводили на двухлучевом спектрофотометре «UV-1601PC» («Shimadzu», Япония) в кювете с длиной оптического пути 1 см, объемом 0,5 мл. В работе использована центрифуга «Minispin» («Eppendorf», Германия).

Определение бактериолитической активности лизоцима

Бактериолитическую активность лизоцима определяли турбидиметрическим методом при длине волны 650 нм, взяв за основу подходы, применяемые для изучения лизиса клеток *Escherichia coli* под воздействием яичного куриного лизоцима [10]. В кювету добавляли буферный раствор, суспензию клеток до конечной величины поглощения (A), равной 0,4–0,5, регистрировали процессы фонового самопроизвольного лизиса в течение 1 мин, затем добавляли фермент. Начальную скорость лизиса определяли по уменьшению поглощения за время от 5 до 25 с с момента добавления фермента. Фоновый лизис клеток в отсутствие фермента в работе не наблюдался.

Изучение сорбции лизоцима на клетках

Для изучения сорбции фермента на клетках использована методика, аналогичная описанной в литературе для *E. coli* [13]. В пробирку помещали суспензию клеток в буферной смеси. Брали суспензию клеток, поглощение которой соответствует концентрации $2 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Добавляли к препарату лизоцим в разном количестве, перемешивали. После инкубации в течение заданного времени суспензию центрифугировали при скорости 3500 об/мин в течение 3 мин. Определяли разницу между исходно добавленным количеством лизоцима и его количеством, оставшимся в надосадочной жидкости после оседания клеток. Концентрацию лизоцима определяли по его актив-

ности на стандартном препарате клеток *M. luteus*, используя калибровочную кривую зависимости активности от концентрации фермента [13].

Эксперимент по сопоставлению данных турбидиметрии и подсчету КОЕ

Для проведения эксперимента готовили 2 мл клеточной суспензии с поглощением $A \approx 0,46$ –0,47 в буферном растворе, 0,05М NaCl (pH 6,7). Добавляли лизоцим до концентрации 5 мкг/мл. Регистрировали изменение оптического поглощения во времени для образца. В определенные промежутки времени отбирали пробы из реакционной смеси для посева на чашки Петри с твердой агаризованной средой. Подсчет КОЕ проводили через 36 ч инкубации при 37°C.

Результаты и обсуждение

На рис. 1, а приведена зависимость оптического поглощения от объема добавленной суспензии клеток и соответственно КОЕ. Как видно, поглощение суспензии нелинейно зависит от числа клеток. На зависимости можно выделить линейный начальный участок, на котором оптическое поглощение пропорционально числу клеток. Как видим, для *L. plantarum* $1,0 \cdot 10^8$ КОЕ/мл соответствует оптическому поглощению 0,55. В дальнейших экспериментах мы использовали суспензию с начальным поглощением 0,4, которое находится на линейном участке зависимости.

На рис. 1, б представлена кинетическая кривая лизиса клеток. На основании экспериментальных данных можно рассчитать степень лизиса Θ_A [10] (долю разрушенных клеток), которая изменяется от 0 (все клетки целы) до 1 (все клетки разрушены). Доля нелизированных клеток соответственно равна $(1 - \Theta_A)$. Для расчета степени лизиса в эксперименте по турбидиметрии использовали формулу [10]:

$$\Theta_A(t) = (A_0 - A(t)) / (A_0 - A_\infty).$$

В данном эксперименте принимаем $A_0 = 0,46$ (значение до добавления фермента), когда все клетки целы. Принимаем значение $A_\infty = 0,36$ (среднее значение для интервала от 200 до 300 мин), когда падение оптического поглощения практически прекратилось, предположительно все клетки разрушены.

Степень лизиса также рассчитываем из независимого эксперимента с подсчетом КОЕ [10]:

$$\Theta_{\text{КОЕ}}(t) = 1 - (\text{КОЕ}(t) / \text{КОЕ}_0)$$

В табл. 1 приведено сопоставление величин Θ , полученных двумя независимыми методами.

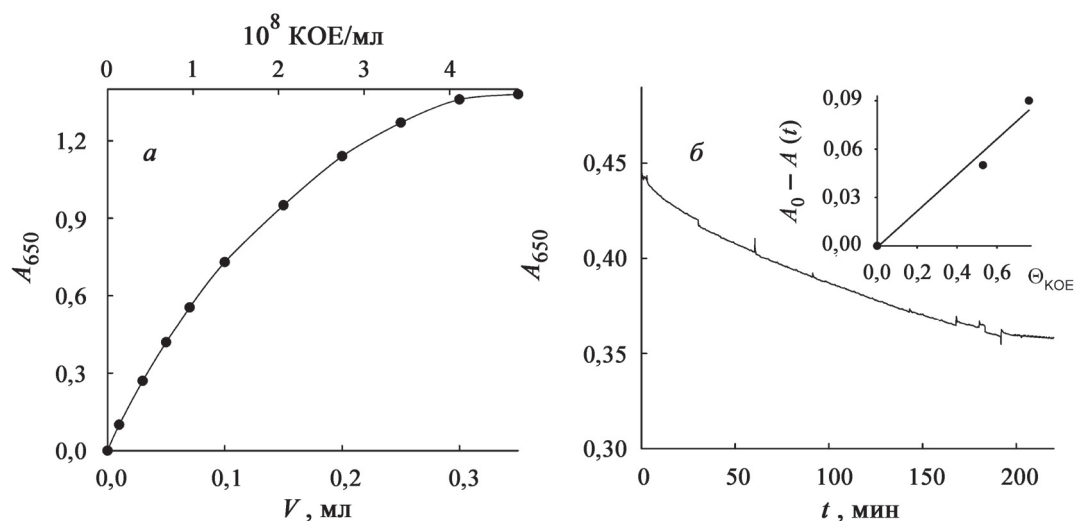


Рис. 1. Зависимость: *а* – оптического поглощения раствора от объема добавленной клеточной суспензии (50 мМ NaCl, pH 6,7); *б* – оптического поглощения суспензии клеток от времени после добавления фермента ($[E] = 5$ мкг/мл, pH 6,7)

Сравнение этих величин показывает, что расчет степени лизиса по КОЕ совпадает с данными, полученными из кривой $A(t)$, что доказывает правильность используемых формул. На врезке рис. 1, *б* представлена зависимость изменения величины показателя $A_0 - A(t)$ от степени лизиса Θ , рассчитанной по КОЕ. Зависимость линейна, а отношение $\Delta\Theta/\Delta A$ в данных условиях равно 8,9. Полученное значение можно в будущем использовать для пересчета скорости изменения оптического поглощения в скорость изменения степени лизиса для клеток *L. plantarum*.

На рис. 2, *а* представлена зависимость скорости лизиса клеток от концентрации фермента. Как видим, скорость лизиса прямо пропорциональна концентрации фермента при малой концентрации последнего. При повышении концентрации фермента зависимость стремится к горизонтальной асимптоте, когда скорость перестает зависеть от концентрации лизоцима. При такой концентрации лизоцима предположительно происходит одновременное множественное повреждение клеточной стенки, ферментативная стадия перестает быть скоростью-лимитирующей и медленной, лизис

теперь определяется стадией осмотического разрыва клетки. Для лизоцима на субстрате *E. coli* [15] зависимости скорости лизиса от концентрации фермента имеют аналогичный вид, но большая скорость лизиса достигается при меньших концентрациях фермента. Можно сделать вывод, что лизоцим действует на *L. plantarum* менее эффективно, чем на *E. coli*. На рис. 2, *а* приведены данные, полученные на препарате как лиофилизированных, так и свежесозревших клеток. Сравнение данных показывает, что наблюдаемые скорости лизиса совпадают, поэтому для измерений корректно использовать препарат лиофилизированных клеток. В таком лиофилизированном препарате не все клетки могут быть жизнеспособны (20–30% жизнеспособных, согласно нашим измерениям КОЕ), однако это не является препятствием для измерения ферментативной скорости вскрытия клеток турбидиметрическим методом. Далее работу проводили с препаратом, полученным из лиофилизированных клеток.

На рис. 2, *б* представлен pH-профиль активности лизоцима на клетках *L. plantarum*. Как видим, оптимум активности находится в области ней-

Таблица 1

Сопоставление данных, полученных методами турбидиметрии и подсчетом КОЕ ($[E] = 5$ мкг/мл)

t , мин	A_{650}	Θ_A	10^7 КОЕ/мл	$\Theta_{КОЕ}$
0	0,46	0	$8,5 \pm 0,5$	0
60	0,41	0,46	$4,0 \pm 0,4$	0,53
180	0,37	0,75	$2,0 \pm 0,4$	0,76

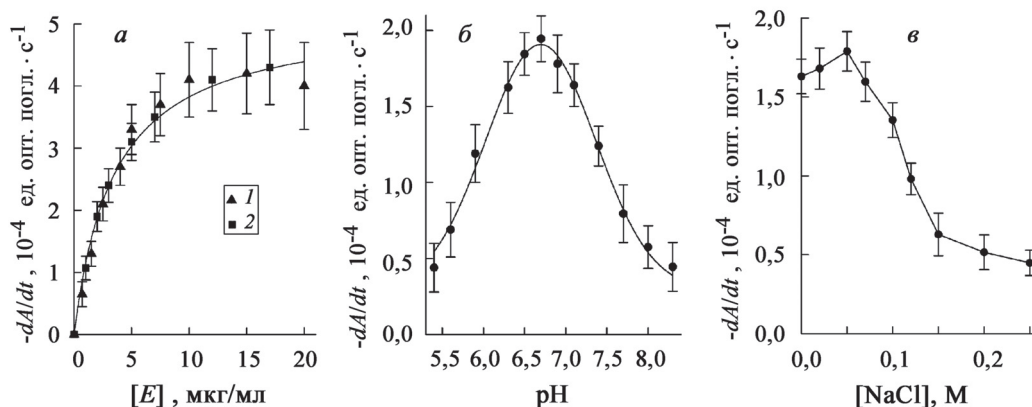


Рис. 2. Зависимость: а – скорости лизиса клеток от концентрации фермента при рН 6,7: 1 – лиофилизированный препарат клеток, 2 – свежесозревшие клетки; б – скорости лизиса клеток от рН ($[E] = 2,5$ мкг/мл); в – скорости лизиса от ионной силы (рН 6,7, $[E] = 2,5$ мкг/мл)

тральных рН (6,7). Согласно литературным данным, для клеток *M. luteus* значение рН-оптимума лизоцима также лежит в нейтральной области рН (7,0–7,1) [16, 17], но для *E. coli* рН-оптимум лежит в слабощелочной области рН (8,7–8,9) [10, 15]. Такое различие значений рН-оптимума может быть обусловлено различиями в сорбции фермента на субстрате при разных значениях рН в случае разных клеток. Явление изменения характера сорбции фермента на субстрате в разных условиях известно для системы лизоцим – *E. coli* [13].

На графике рис. 2, в представлена зависимость скорости лизиса клеток от концентрации NaCl. Показан высокий уровень активности при концентрациях NaCl 0–0,06 М и снижение уровня активности при концентрации NaCl 0,1 М и выше. Схожий характер зависимости, согласно литературным данным, наблюдался для лизоцима на субстрате *E. coli* с той разницей, что для субстрата *E. coli* высокий уровень активности наблюдался при концентрациях NaCl 0,03–0,04 М, а снижение наблюдалось уже при концентрации соли 0,06 М [10]. Снижение скорости лизиса при повышении концентрации соли может объясняться уменьшением скорости осмотического разрыва клетки [10].

На рис. 3 приведены зависимости скорости лизиса от концентрации субстрата при разных значениях рН. Как видим, в координатах Лайнуивера–Берка зависимости можно считать практически линейными. Рассчитанные по уравнению Михаэлиса–Мэнтен значения K_m и V_{\max} приведены в табл. 2. Значение K_m практически не зависит от рН. При разных рН изменяется только V_{\max} .

На рис. 4, а приведены изотермы сорбции лизоцима на клетках, полученные при разном времени инкубации препарата. Все зависимости удовлет-

ворительно описываются уравнением Лэнгмюра. Данные для 3, 5 и 7 мин практически не различаются в пределах погрешности. Таким образом, можно утверждать, что 3 мин – достаточное время для установления адсорбционного равновесия. Во всех последующих экспериментах для определения параметров сорбции брали время 5 мин, что достаточно для установления равновесия и методически удобно для проведения эксперимента. Для проверки обратимости сорбции был проведен дополнительный эксперимент: к осадку клеток из эксперимента по адсорбции (звезды-точки 1 и 2 на рис. 4, а) был добавлен буферный раствор, клетки ресуспендировали и инкубировали в течение 5 мин, затем их снова осаждали центрифугированием и измеряли концентрацию лизоцима. Затем проводили сравнение измеренной концентрации лизоцима в надосадочной жидкости с рассчитанной теоретически из количества связанного с клетками лизоцима в растворе в эксперименте по адсорбции. Решаем систему уравнений

$$\Gamma = (\Gamma_{\max} \cdot [E]) / (K_d + [E]),$$

$$\Gamma_0 \cdot N = [E] \cdot M_r + \Gamma \cdot N,$$

где Γ_{\max} – максимальное количество связываемого клеткой фермента (г/клетка) (сорбционная емкость), $[E]$ – концентрация свободного фермента (моль/л), K_d – константа десорбции (моль/л), Γ_0 – количество лизоцима в осадке после эксперимента по адсорбции (г/клетка), Γ – количество связанного лизоцима после инкубации с новой порцией буфера (г/клетка), N – число клеток в 1 л, M_r – молярная масса лизоцима. $\Gamma_{\max} = (3,6 \pm 0,3) \cdot 10^{-9}$ г/клетка, $K_d = (2,9 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$ М. Значения $[E]$ для точки 1, полученные экспериментально и расчетом, равны 43 ± 17 и 66 ± 13 мкг/мл соответственно. Значения

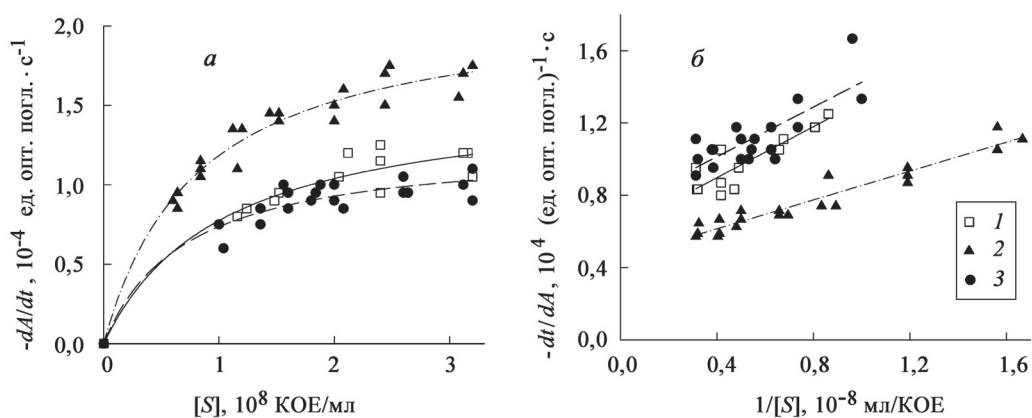


Рис. 3. Зависимость начальной скорости лизиса от концентрации клеток в растворе при 0,05 М NaCl, $[E] = 2$ мкг/мл и при разных значениях pH (1 – 6,0; 2 – 6,7; 3 – 7,6)

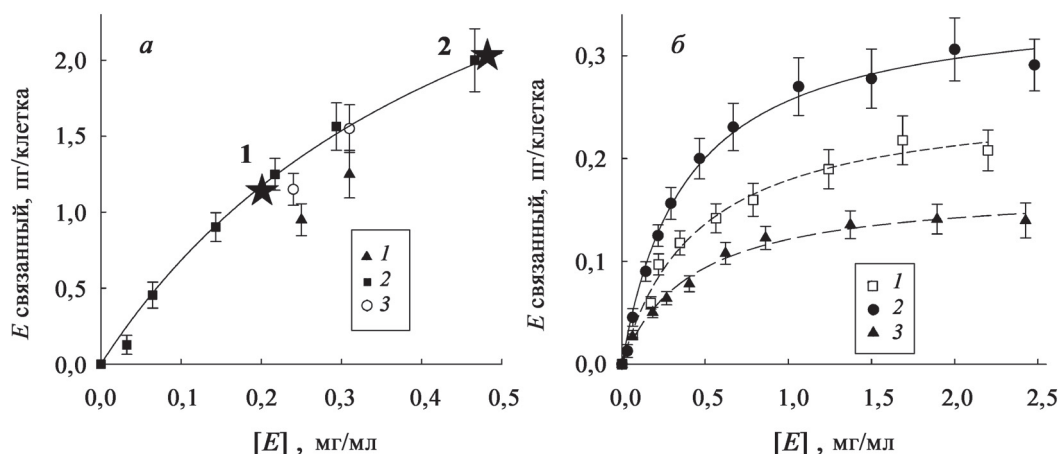


Рис. 4. Изотермы адсорбции: а – при разном времени инкубации, мин (1 – 3, 2 – 5, 3 – 7), 0,01М Tris-MES-CH₃COOH, 0,05 NaCl, pH 6,7; б – при разных значениях pH (1 – 6,0; 2 – 6,7; 3 – 7,6), 0,05 М NaCl

$[E]$ для точки 2, полученные экспериментально и расчетом, равны 150 ± 60 и 122 ± 24 мкг/мл соответственно. Таким образом, подтверждена обратимость сорбции лизоцима на клетках.

На рис. 4, б приведены изотермы сорбции лизоцима на клетках при разных pH. Все зависимости удовлетворительно описываются уравнением Лэнгмюра. Рассчитанные параметры уравнения Лэнгмюра приведены в табл. 3. Как видим, K_d практически не зависит от pH. Ранее было выявлено, что от pH также практически не зависит наблюдаемое значение K_m , которое, имея сложный физический смысл, тем не менее тоже характеризует эффективность связывания фермента с субстратом. Обнаружено, что от pH заметно зависит $\Gamma_{\text{макс}}$. Этот параметр имеет физический смысл максимального количества лизоцима, способного связаться с поверхностью клетки в данных условиях. Получается, что в pH-оптимуме активности фермента нет преиму-

щества по константам связывания, но увеличивается количество центров связывания фермента субстратом. При этом связывание фермента с клетками-субстратом носит продуктивный характер и повышает эффективность катализа. Причина подобного явления, детальное объяснение физического смысла подобного соотношения параметров требуют дополнительных исследований, выходящих за рамки данной работы. Следует также отметить, что в ряде работ по изучению воздействия ферментов на полимерные субстраты [18, 19] отмечалось, что нелинейная зависимость скорости от концентрации фермента также может быть связана с явлением сорбции фермента на субстрате, когда субстрат «насыщается» связанным ферментом, и скорость реакции перестает зависеть от общей концентрации фермента в системе. В нашем случае такое объяснение нелинейности зависимости скорости лизиса от концентрации фермента маловероятно,

Т а б л и ц а 2

Значения величин K_M и V_{\max}

pH	K_M , 10^7 КОЕ/мл	V_{\max} , 10^{-4} ед. опт. погл. \cdot с $^{-1}$
6,0	5,7 \pm 0,6	3,3 \pm 0,6
6,7	4,6 \pm 0,4	4,4 \pm 0,4
7,6	4,7 \pm 0,7	2,7 \pm 0,5

Т а б л и ц а 3

Характеристики сорбции лизоцима на клетках при разных значениях pH

pH	K_d , 10^{-5} М	Γ_{\max} (сорбционная емкость), пг/клетка
6,0	3,2 \pm 0,5	2,6 \pm 0,3
6,7	2,9 \pm 0,4	3,6 \pm 0,3
7,6	2,8 \pm 0,4	1,7 \pm 0,2

так как определенные нами величины констант десорбции фермента в сотни раз превышают концентрации фермента при «выходе на плато» кривой зависимости скорости лизиса.

Таким образом, в результате работы были разработаны методики измерения активности лизоцима и измерения его сорбции на клетках *L. plantarum*. Определены параметры пересчета для

изменения оптического поглощения в изменение степени лизиса клеток *L. plantarum*. Показано, что pH-оптимум на субстрате *L. plantarum* лежит в нейтральной области (6,7). Определены сорбционные характеристики. Обнаружено, что при оптимальном значении pH наблюдается увеличение наблюдаемой сорбционной емкости клеток *L. plantarum* по связыванию лизоцима.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 15-14-00012).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Guidone A., Zotta T., Ross R.P., Stanton C., Rea M.C., Parente E., Ricciardi A. // LWT – Food Sci. Technol. 2014. Vol. 56. P. 69.
- Siragusa S., Angelis M., Calasso M., Campanella D., Minervini F., Cagno R., Gobetti M. // J. Proteomics. 2014. Vol. 96. P. 366.
- Siezen R.J., Tzeneva V.A., Castioni A., Wels M., Phan H.T.K., Rademaker J.L.W., Starrenburg M.J.C., Kleerebezem M., Molenaar D., Hylckama-Vlieg J.E.T. van // Environ. Microbiol. 2010. Vol. 12. P. 758.
- Merk K., Borelli C., Korting H.C. // Intern. J. Med. Microbiol. 2005. Vol. 295. P. 9.
- Reid G., Burton J. // Microbes and Infections. 2002. Vol. 4. P. 319.
- Parente E., Ciocia F., Ricciardi A., Zotta T., Felis G.E., Torriani S. // Intern. J. Food Microbiol. 2010. Vol. 144. P. 270.
- Lee K.B., Rhoa B.S., Pi K.B., Kima H.J., Choi Y.J. // J. Biotechnol. 2011. Vol. 153. P. 1.
- Ferrando V., Quiberoni A., Reinhermer J., Suarez V. // Food Microbiol. 2015. Vol. 48. P. 63.
- Dias R., Vilas-Boas E., Campos F.M., Hogg T., Couto J.A. // Food Microbiol. 2015. Vol. 49. P. 6.
- Levashov P.A., Sedov S.A., Shipovskov S., Belogurova N.G., Levashov A.V. // Anal. Chem. 2010. Vol. 82. P. 2161.
- Mitchell G.J., Nelson D.C., Weitz J.S. // Phys. Biol. 2010. Vol. 7. 046002.
- Рабинович М.Л., Клесов А.А., Березин И.В. // Биоорг. химия. 1976. Vol. 2. № 5. С. 689.
- Sedov S.A., Belogurova N.G., Shipovskov S., Levashov A.V., Levashov P.A. // Coll. Surf. B. 2011. Vol. 88. P. 131.
- Man J.D. de, Rogosa M., Sharpe M.E. // J. Appl. Bacteriol. 1960. Vol. 23. P. 130.
- Левашов П.А., Седов С.А., Белогурова Н.Г., Шиповсков С.В., Левашов А.В. // Биохимия. 2012. Т. 77. № 11. С. 1567.
- Рабинович М.Л., Клесов А.А., Березин И.В. // Биоорг. химия. 1976. Т. 2. № 6. С. 795.
- Смотров О.И., Борзенков В.М., Суrowцев В.И. // Биоорг. химия. 2011. Т. 37. № 5. С. 631.
- Попова Г.Ю., Еремеев Н.Л., Айсина Р.Б., Казанская Н.Ф. // Бюл. эксп. биол. мед. 1989. Т. 17. № 5. С. 561.
- Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Klyosov A.A. // Enz. Microbiol. Technol. 1985. Vol. 7. N 7. P. 346.

Поступила в редакцию 01.08.15

**DETERMINATION OF BACTERIOLYTIC ACTIVITY
AND MEASUREMENT OF ENZYME SORPTION BY CELLS
IN THE SYSTEM OF LIVING *Lactobacillus plantarum***

**D.A. Matolygina, H.E. Osipova, S.A. Smirnov, N.G. Belogurova, N.L. Ereemeev,
V.I. Tishkov, A.V. Levashov, P.A. Levashov**

(Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University)

It has been developed turbidimetric method for determining the activity of bacteriolytic enzymes with live cells *Lactobacillus plantarum* as substrate. Measuring method for enzyme sorption on cells under same conditions is described. Chicken egg lysozyme was used as the standard model enzyme. The correctness of the calculations of kinetic parameters is proved by counting of colony forming units (CFU). The physicochemical parameters of enzyme adsorption on cells are calculated and the correctness of the obtained equilibrium constants of desorption is verified.

Key words: chicken egg lysozyme, *Lactobacillus plantarum*, bacteriolytic activity.

Сведения об авторах: Матолыгина Дарья Андреевна – студентка химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (dashunechka.m@yandex.ru); Осипова Елена Эдуардовна – студентка химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (polza_1993@mail.ru); Смирнов Сергей Александрович – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (sergik-2001@yandex.ru); Белогурова Наталья Георгиевна – доцент кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (nbelog@mail.ru); Еремеев Николай Леонидович – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук, профессор (eremeev@enzyme.chem.msu.ru); Тишков Владимир Иванович – профессор кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, докт. хим. наук (vitishkov@gmail.com); Левашов Андрей Вадимович – профессор кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук, профессор (a_levashov@bk.ru); Левашов Павел Андреевич – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, ст. науч. сотр. Института экспериментальной кардиологии Кардиологического научного центра Министерства здравоохранения Российской Федерации, канд. хим. наук (levashov@yahoo.com)