

УДК 57.083.3

РАЗРАБОТКА НЕПРЯМОГО ТВЕРДОФАЗНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ ЛЕВОВРАЩАЮЩЕГО СТЕРЕОИЗОМЕРА ОФЛОКСАЦИНА (ЛЕВОФЛОКСАЦИНА) В МОЛОКЕ

И.А. Шанин¹, Нгуен Ти Диу Тхай³, С.А. Еремин^{1,2}

¹Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова; ²Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова; ³Институт биотехнологии Вьетнамской академии науки и технологий; e-mail: nimenor-08@mail.ru

Получены поликлональные антитела на левофлоксацин, синтезированы конъюгаты левофлоксацина с катионизированным сывороточным альбумином для иммунизации кроликов и с овалбумином в целях разработки непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) для детектирования левофлоксацина. Разработанная методика ИФА характеризуется диапазоном определяемых концентраций левофлоксацина от 0,03 до 0,41 нг/мл и пределом определяемых концентраций, равным 0,01 нг/мл. Из 28 проверенных фторхинолонов перекрестной реактивностью обладают офлоксацин (145%), марбофлоксацин (82%), правовращающая форма офлоксацина (68%), руфлоксацин (67%), гареноксацин (24%). Оптимизированная методика ИФА позволяет детектировать левофлоксацин в молоке от 0,33 до 3,34 нг/мл. Доля открытия составила в среднем 96% при относительном стандартном отклонении 3%. Были протестированы 45 реальных образцов молока, в пяти из них с помощью разработанной методики детектировались концентрации на уровне 1–3 нг/мл, что удовлетворяет предельно допустимой (100 нг/мл) концентрации фторхинолонов в молоке.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, ИФА, конъюгат с белком, фторхинолоны, офлоксацин, левофлоксацин, молоко.

В настоящее время синтетические антибактериальные средства широко используются в ветеринарии. Применяются разные антибиотики: пенициллины, цефалоспорины, тетрациклины, аминогликозиды, сульфамидные препараты, амфениколы и фторхинолоны. Фторхинолоны занимают особое место в силу своего широкого спектра действия.

Противомикробные средства вводят в вену крупному рогатому скоту до убоя или непосредственно после него, что позволяет увеличить срок сохранности мяса. Их также добавляют в рецептуру комбикормов для профилактики заболеваний, поскольку на животноводческих фермах практически невозможно отследить животных на ранней стадии болезни. С экономической точки зрения выгоднее добавлять именно фторхинолоны, в частности офлоксацин (смесь стереоизомеров) или его левовращающий стереоизомер – левофлоксацин, который и обладает антимикробными свойствами в отличие от инертного правовращающего стереоизомера. Фторхинолоны в организме почти не метаболизируются, а кроме того, имеют свойство накапливаться по причине большо-

го объема распределения. В итоге фторхинолоны попадают в продукты питания (мясо, молоко и др.). В ряде источников [1] есть указания на то, что не рекомендуется назначать эту группу антибактериальных веществ детям (формирование костно-суставной системы) и пожилым людям (повышенная опасность травмирования сухожилий), а ведь именно для этих групп населения молоко один из основных пунктов в рационе. Кроме того, следует отметить, что согласно СанПиН 2.3.2.1078-01 «О введении в действие санитарных правил» установлена предельно допустимая концентрация фторхинолонов на уровне 100 нг/мл. Таким образом, становится очевидной необходимость контроля содержания синтетических антибактериальных средств, в частности фторхинолонов, в продуктах питания и особенно в молоке.

Из существующих в настоящее время иммунохимических методов детектирования низкомолекулярных веществ наиболее широко применяются иммуноферментный анализ (более чувствительный) и иммунохроматографический анализ (быстрый и простой). К примеру, в 2013 г. в печать поступила статья [2],

в которой описывается селективное детектирование офлоксацина на уровне 30 нг/мл методом иммунохроматографии на тест-полосках на основе поликлональных антител. В этом же году была опубликована работа по определению 20 фторхинолонов на уровне 0,23 нг/мл с помощью иммуноферментного анализа с хемилюминесцентным детектированием на основе рекомбинантных антител [3].

Цель данной работы – получение поликлональных антител к левофлоксацину и разработка на их основе селективного непрямого иммуноферментного анализа для определения левофлоксацина в молоке.

Экспериментальная часть

Материалы и реагенты

Для измерения аналитического сигнала использовали спектрофотометр «ЭФОС 9305» фирмы ОАО МЗ «Сапфир». Измерения проводили при длине волны 450 нм.

При разработке ИФА для определения левофлоксацина использовали планшеты «ХЕМА» высокой сорбционной способности.

Стандарты и другие химические вещества: R-офлоксацин (R-ОФЛ) фирмы «Santa Cruz Biotechnology», США; Офлоксацин (R,S-ОФЛ), левофлоксацин (ЛЕВ), гареноксацин (ГАР), пефлоксацин (ПЕФ), гатифлоксацин (ГАТ), клинафлоксацина гидрохлорид (КЛИ), сарафлоксацина гидрохлорид (САР), ломефлоксацин (ЛОМ), тозуфлоксацин (ТОЗ), спарфлоксацин (СПА), данофлоксацин (ДАН), дифлоксацин (ДИФ), пазуфлоксацин (ПАЗ), марбофлоксацин (МАР), моксифлоксацин (МОКС), руфлоксацин (РУФ), норфлоксацин (НОР), цiproфлоксацин (ЦИП), энрофлоксацин (ЭНР), пипемидиевая кислота (ПИП), налидиксовая кислота (НАЛ), оксолиниевая кислота (ОКС), орбифлоксацин (ОРБ), энноксацин (ЭНО), надифлоксацин (НАД), циноксацин (ЦИН), флюмеквин (ФЛЮ); бычий сывороточный альбумин (БСА), овальбумин (ОВА), казеин; 1-этил-3-(диметиламинопропил) карбодиимид гидрохлорид (ЭДА), N-гидроксисукцинимид (ГСИ), все фирмы «Sigma-Aldrich Corporation» (США).

Буферные растворы, соли и другие расходные реагенты: 0,01 М фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ); 0,01 М фосфатно-солевой буферный раствор с 0,1% казеина и 0,1% твина-20 (ФСБКТ); насыщенный раствор сульфата аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; раствор субстратной смеси 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ).

Синтез иммунореагентов

На низкомолекулярные вещества (приблизительно до 2000 Да) антитела не образуются, поэтому синтезировали конъюгат левофлоксацина с высокомолекулярным носителем – белком. В структуре фторхинолонов есть реакционно-способная карбоксильная группа. Для иммунизации синтезировали конъюгат с катионизированным бычьим сывороточным альбумином, для сорбирования в лунки планшета использовали конъюгат левофлоксацина с овальбумином. Для подшивки фторхинолонов к белку применяли метод карбодиимидной активации (рис. 1), который чаще всего используют для этой цели [4–6]. Первый этап – активация карбоксильной группы: фторхинолон, 1-этил-3-(диметиламинопропил) карбодиимид гидрохлорид и N-гидроксисукцинимид растворяют в диметилформамиде и инкубируют. Второй этап – растворение белка в карбонатном буфере (рН 9,5) и термостатирование в течение 1 ч при температуре +4°C. Третий этап – добавление к раствору белка активированного фторхинолона при интенсивном перемешивании с последующей инкубацией при комнатной температуре. Четвертый этап – очистка от низкомолекулярных непрореагировавших веществ диализом в течение 3–5 дней против дистиллированной воды при частой ее смене. Пятый этап – разаликвочивание полученного раствора конъюгата, его лиофилизация и хранение.

В ряде статей [6, 7] в целях увеличения числа молекул гаптена, связывающегося с молекулой белка, описано применение катионизированного бычьего сывороточного альбумина, т.е. модифицированного белка-носителя. Так, для увеличения числа первичных аминогрупп в составе белка наиболее часто используют этилендиамин гидрохлорид.

Получение антител

Для получения поликлональных антител обычно готовят эмульсию конъюгата в растворе с полным адьювантом Фрейнда для первой иммунизации и с неполным адьювантом Фрейнда для последующих иммунизаций. Свежеприготовленной эмульсией подкожно иммунизируют кроликов в 10–15 мест вдоль позвоночника. Иммунизацию повторяют через определенное время – цикл иммунизации. Через несколько таких циклов иммунизации осуществляют забор крови из краевой ушной вены, после чего выделяют сыворотку, содержащую антитела. После этого можно проводить очистку насыщенным раствором суль-

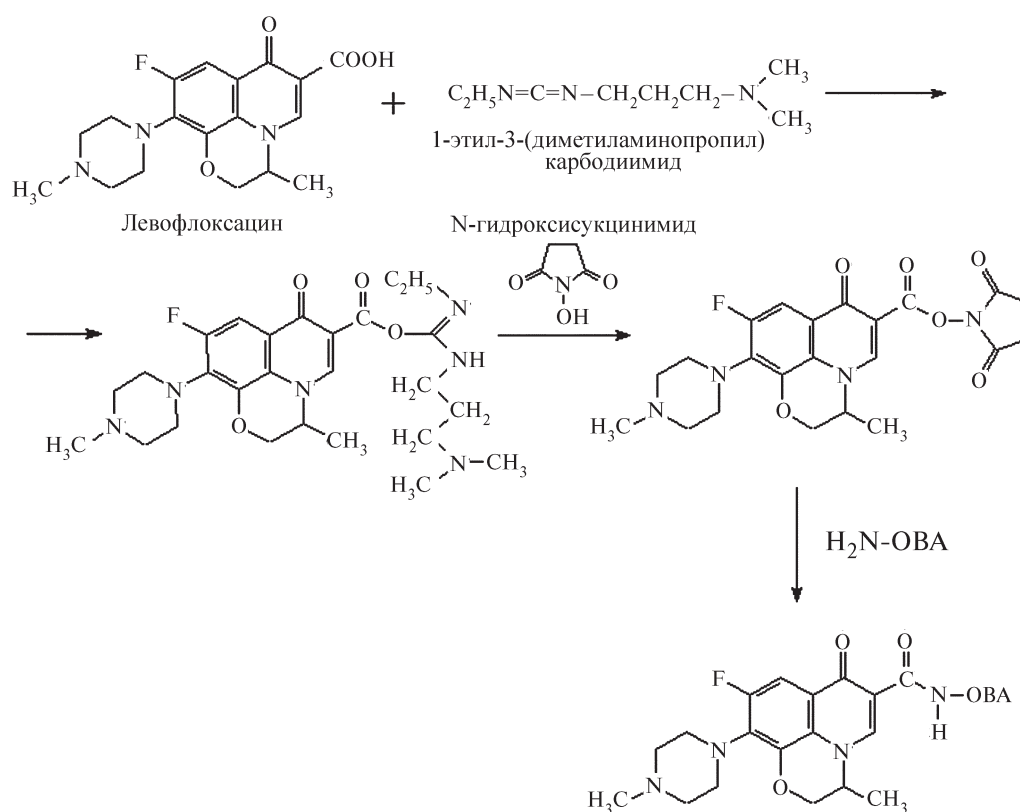


Рис. 1. Схема синтеза конъюгата левофлоксацина с овальбумином ЛЕВ-ОВА

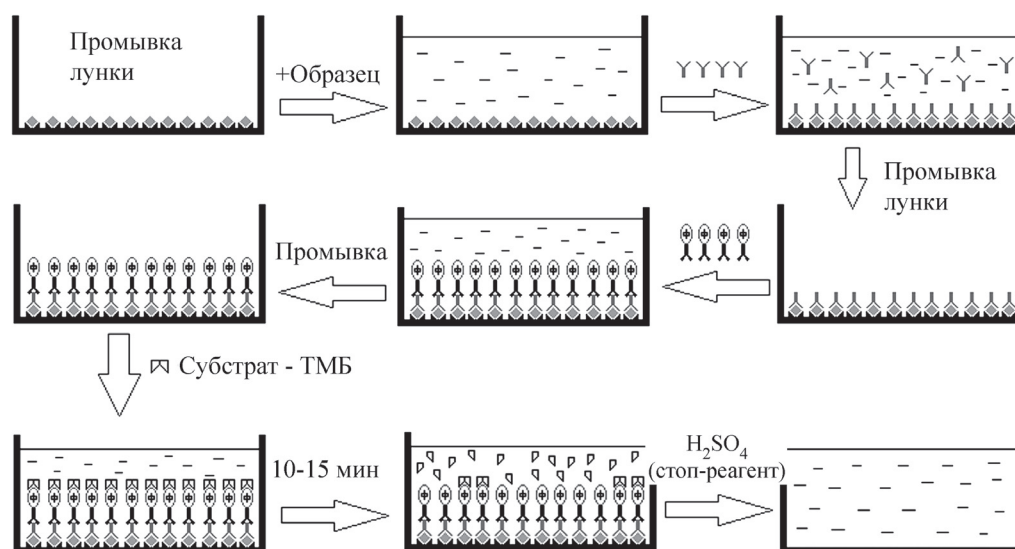


Рис. 2. Схема проведения ИФА

фата аммония в целях выделения фракции IgG. Полученный раствор антител лиофилизируют или консервируют 1:1 глицерином и хранят при -20°C .

Непрямой конкурентный ИФА

В лунки полистиролового планшета сорбируют конъюгат антигена с белком-носителем, отличным

от того, который использовался для иммунизации, с целью уменьшить неспецифические взаимодействия. На первой стадии анализа (рис. 2) в лунке смешивают раствор стандарта (аналита) с раствором антител и инкубируют. На этой стадии идет конкурентная реакция взаимодействия между антигеном в растворе и антигеном, сорбированным на планшете, за огра-

ниченное число участков связывания антител. Промывают планшет несколько раз. Далее прибавляют раствор конъюгата антивидовых антител, меченных ферментной меткой, и инкубируют. Затем отмывают планшет несколько раз, вносят в лунки субстратную смесь и снова инкубируют. С течением времени развивается окрашивание, что свидетельствует о протекающей ферментативной реакции, которую останавливают, меняя pH добавлением кислоты, при этом цвет раствора меняется. После этого измеряют оптическую плотность при определенной длине волны на планшетном спектрофотометре.

Предел определяемых концентраций и специфичность анализа

Для определения аналитических характеристик использовали программу для обработки результатов Origin 8.5. Строили графики зависимости относительного сигнала от логарифма концентрации, определяли линейный участок и получали уравнение прямой с коэффициентом аппроксимации. Пределом определяемых концентраций считали концентрацию, при которой значение аналитического сигнала падает на 10%, т.е. отличается от такового сигнала при нулевом значении концентрации.

Диапазон определяемых концентраций – область линейного падения сигнала. Обычно это участок калибровочного графика, составляющий 20–80% от разницы между максимальным (при нулевой концентрации вещества) и минимальным (при максимальной концентрации вещества) значениями сигнала оптической плотности.

Специфичность методики оценивали по перекрестному реагированию с другими веществами. Процент перекрестного реагирования находили по формуле:

$$CR, \% = IC_{50}(\text{левофлоксацин}) / IC_{50}(X),$$

где $IC_{50}(\text{левофлоксацин})$ – концентрация левофлоксацина, при которой происходит падение сигнала оптической плотности на 50%, $IC_{50}(X)$ – концентрация перекрестно реагирующего вещества, при которой происходит падение сигнала оптической плотности на 50%.

Пробоподготовка образцов молока

Молоко, как и любой другой объект для анализа, характеризуется матрицей, которая мешает при определении в нем веществ. Способы пробоподготовки могут быть самыми разнообразными и меняться в зависимости от используемого метода анализа. В статье [8] молоко центрифугировали в течение 30 мин

при 10000 об/мин, в работе [7] проблема была решена простым разведением в 10 раз, в статье [9] приводятся данные о прямом определении фторхинолона (флюмеквина) в сыром молоке. В данной работе для устранения влияния эффекта матрицы мы сравнивали описанные выше методы и метод высаливания насыщенным сульфатом аммония. При добавлении насыщенного сульфата аммония выпадают в осадок белки, а слой жиров формируется на поверхности. Таким образом, возникает необходимость отобрать надосадочную жидкость и при этом не загрязнить образец жирами. Мы готовили серию разведений и определяли необходимую кратность разведения для полного нивелирования эффекта матрицы.

Оценка правильности метода и воспроизводимости

Воспроизводимость характеризуется коэффициентом вариации (относительное стандартное отклонение), а правильность – процентом открытия. Для оценки этих характеристик проводится тест «введено-найдено». Важно использовать достоверно чистые объекты (молоко, мясо и т.д.). Из них готовятся образцы, загрязненные определяемым веществом. Затем проводятся пробоподготовка и непосредственно анализ. По полученным данным определяются аналитические характеристики разработанной методики.

Результаты и их обсуждение

Синтез катионизированного бычьего сывороточного альбумина

В дистиллированной воде (2 мл) растворяли 0,3 мкмоль БСА, затем добавляли 30 мкмоль ЭДА и 30 мкмоль ГСИ, инкубировали реакционную смесь 30 мин при интенсивном перемешивании. Полученный раствор добавляли по каплям к раствору 30 мкмоль этилендиамина гидрохлорида в 10 мл карбонатного буфера с 50 мкл триэтиламина. Инкубировали 2 ч при интенсивном перемешивании. От непрореагировавших соединений очищали диализом против дистиллированной воды три дня с частой ее сменой, последние два раза проводили диализ против карбонатного буфера и использовали для синтеза конъюгатов.

Синтез конъюгатов

Краткая схема синтеза:

15 мкмоль ЛЕВ + 30 мкмоль ЭДА + 30 мкмоль ГСИ
в 1 мл диметилформамида.

Инкубировали в течение 2 ч при интенсивном перемешивании. После этого к приготовленному ранее раствору катионизированного белка добавляли

медленно по каплям при интенсивном перемешивании раствор активированного фторхинолона и инкубировали смесь 5 ч при комнатной температуре и интенсивном постоянном перемешивании. Далее проводили очистку от непрореагировавших низкомолекулярных веществ диализом в течение 3–5 дней против дистиллированной воды. Полученный конъюгат делили на аликвоты, лиофилизировали и хранили при температуре +4°C.

Получение антител

Поликлональные антитела получали на самцах кроликов породы Калифорнийские в возрасте 3 мес. Иммунизацию проводили с двухнедельными интервалами свежеприготовленной эмульсией (1–2 мг конъюгата в воде) для инъекций с адъювантом Фрейнда во множество мест (до 15) в области позвоночника. На восьмой день после каждой третьей иммунизации проводили забор крови из краевой вены уха с помощью вакуумных пробирок с гелем и активатором свертывания. Центрифугированием выделяли сыворотку, которую очищали методом трехкратного высаживания 50%-м сульфатом аммония при температуре +4°C, получая таким образом фракцию IgG, которую растворяли в фосфатном буфере. Полученный раствор иммуноглобулинов смешивали в соотношении 1:1 с глицерином, делили на аликвоты и хранили при –20°C.

Непрямой конкурентный ELISA

Готовили растворы конъюгата ЛЕВ–ОВА с разными концентрациями (1; 0,5; 0,25 и 0,1 мкг/мл) в фосфатном солевом буферном растворе. Проводили сорбцию при +4°C в течение 12 ч. Отмывали дистиллированной водой два раза. Сушили при комнатной температуре в течение двух дней. Готовые к использованию планшеты хранили при комнатной температуре.

Готовили растворы антител (разведение 2000, 4000, 6000) в фосфатном солевом буферном растворе с добавлением 0,1% казеина и 0,1% твина-20. Антивидовые антитела, меченные пероксидазой хрена, готовили в наиболее оптимальном разведении (5000), при котором они не оказывают влияния на фоновый сигнал. Методом титрования найдено оптимальное сочетание реагентов. Оптимальная концентрация конъюгата ЛЕВ–ОВА составляет 0,5 мкг/мл, оптимальное разведение раствора антител против левофлоксацина – 4000. При проведении анализа в лунку добавляли 50 мкл стандарта/аналита и 50 мкл рабочего раствора антител. Смесь инкубировали 1 ч

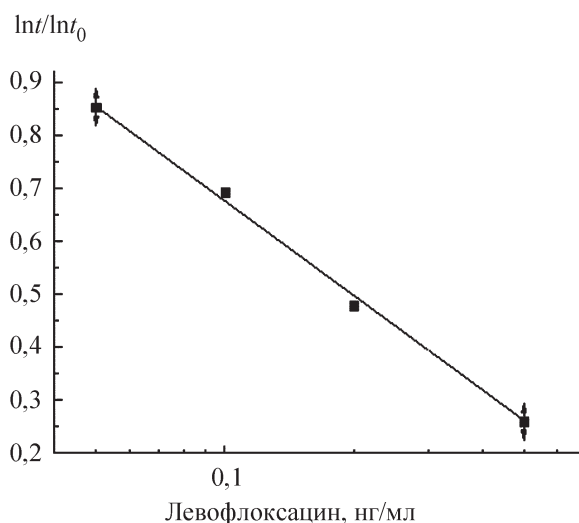


Рис. 3. Калибровочный график для определения левофлоксацина в молоке: $y = (0,08 \pm 0,02) - (0,59 \pm 0,01) \times X (R^2 = 0,998), n = 3$

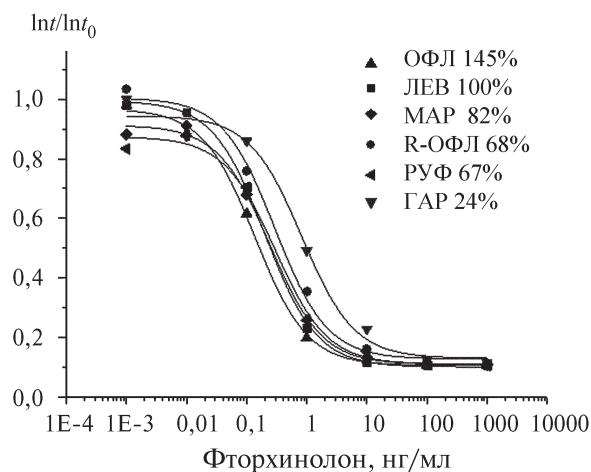


Рис. 4. Процент перекрестного реагирования для разработанного иммуноферментного анализа на левофлоксацин

при +37°C. Отмывали 3 раза по 250 мкл дистиллированной водой. Добавляли 100 мкл рабочего раствора антивидовых антител, меченных пероксидазой хрена. Инкубировали 30 мин при +37°C. Проводили отмывку 5 раз по 250 мкл дистиллированной водой. Добавляли 100 мкл субстратной смеси (ТМБ). Инкубировали 10–20 мин при +37°C. Останавливали ферментную реакцию 50 мкл раствора 2М серной кислоты. Далее проводили измерение интенсивности при 450 нм на планшетном спектрофотометре.

По полученным данным строили калибровочный график и находили диапазон определяемых концентраций, который составил от 0,03 мкг до 0,41 нг/мл, предел определяемых концентраций оказался равен 0,01 нг/мл (рис. 3).

В целях оценки специфичности метода была определена перекрестная реактивность с антибиотиками, остаточное количество которых нормировано в образцах молока. Показано, что пенициллин, тетрациклин, хлорамфеникол и стрептомицин не оказывают влияния на результаты определения левофлоксацина. Была также проверена перекрестная реактивность (рис. 4) с близкими по структуре фторхинолонами. Из 28 проверенных фторхинолонов перекрестной реактивностью обладали офлоксацин (145%), марбофлоксацин (82%), правовращающая форма офлоксацина (68%), руфлоксацин (67%) и гареноксацин (24%).

Пробоподготовка образцов молока

Сравнивали три способа пробоподготовки молока: прямое разбавление образцов молока, центрифугирование с последующим разбавлением и обработка насыщенным сульфатом аммония с последующим разбавлением. Было подобрано оптимальное соотношение насыщенного раствора сульфата аммония и молока, оно составило 2:3 соответственно. Первые два варианта пробоподготовки характеризовались оптимальным фактором разбавления, равным 10. В случае с сульфатом аммония было необходимо разбавить образец в 4 раза, таким образом, суммарный фактор разбавления составил 6,68, что делает методику несколько более чувствительной, чем при разбавлении в 10 раз. Кроме того, при обработке насыщенным сульфатом аммония, образцы можно хранить при +4°C достаточно долго, что дает возможность проводить анализ в удобное время и не зависеть от количества образцов, которые нужно проанализировать.

Воспроизводимость и правильность метода

Для проведения теста «введено-найдено» готовили образцы молока с известными концентрациями левофлоксацина на основе козьего натурального молока, достоверно незагрязненного антибиотиками, в том числе фторхинолонами. Приготовленные образцы молока имели концентрацию 0,5; 1,0; 1,5 и 3,0 нг/мл. Проводили пробоподготовку и анализировали методом иммуноферментного анализа. Результаты приведены в таблице. Воспроизводимость характеризуется коэффициентом вариации (стан-

Результаты теста «введено-найдено». Оценка правильности и воспроизводимости

Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл	КВ, %	Процент открытия, %
0,0	не обнаружено		
0,5	0,46±0,01	3	85–100
1,0	1,03±0,01	1	100–105
1,5	1,40±0,10	7	82–107
3,0	2,78±0,06	2	91–95

дартным отклонением), который в рамках одного эксперимента должен быть меньше 10%. Правильность определяется процентом открытия, который должен находиться в интервале от 60 до 160%. Обе характеристики описанной методики удовлетворяют принятым нормам.

Определение левофлоксацина в молоке

Были закуплены 45 образцов молока и молочных смесей разных производителей с целью апробации разработанной методики. Таким образом, удалось зафиксировать 5 образцов, которые дали положительный результат (3,53; 1,36; 1,32; 0,5 и 0,35 нг/мл). При этом все протестированные образцы удовлетворяли установленной предельно допустимой концентрации фторхинолонов в молоке (100 нг/мл).

Таким образом, в результате проведенной работы синтезирован конъюгат левофлоксацина с катионизированным бычьим сывороточным альбумином для иммунизации и разработана методика конкурентного гетерогенного твердофазного иммуноферментного анализа для селективного детектирования левофлоксацина и близких по структуре соединений. Предел обнаружения составил 0,01 нг/мл, диапазон определяемых концентраций от 0,03 до 0,41 нг/мл при определении левофлоксацина в фосфатном солевом буферном растворе.

Диапазон определяемых концентраций при определении левофлоксацина в образцах молока составил от 0,33 до 3,34 нг/мл. Доля открытия составила в среднем 96% при относительном стандартном отклонении 3%. Все протестированные 45 образцов молока при анализе с помощью разработанной методики удовлетворяли установленной предельно допустимой концентрации (не более 100 нг/мл).

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 13-03-93000-Вьет_a (VAST.NTQT.Nga.03/13-14) «Разработка нового метода ИФА с использованием полимеров с молекулярными отпечатками в качестве антител для определения лекарств в продуктах питания»), Института биохимии им. А.Н. Баха и ООО «ХЕМА».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М., 2008.
2. Nadezhda A. Byzova, Nataliya I. Smirnova, Anatoly V. Zherdev, Sergei A. Eremin, Ilya A. Shanin, Hong-Tao Lei, Yuanming Sun, Boris B. Dzantiev // *Talanta* (in-press, 2013). Accepted Manuscript, Available online 30 October 2013 (in-press, 2013).
3. Xiaoqi Tao, Min Chen, Haiyang Jiang, Jianzhong Shen, Zhanhui Wang, Xia Wang, Xiaoping Wu, Kai Wen // *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. **405**. N 23. P. 7477.
4. Shengxin Lu, Yulan Zhang, Jingting Liu, Chengbiao Zhao, Wei Liu, Rimo Xi // *J. Agric. Food Chem.* 2006. **54**. P. 6995.
5. Bin Huang, Yun Yin, Lei Lu, Hai Ding, Lin Wang, Ting Yu, Jia-jin Zhu, Xiao-dong Zheng, Yan-zhen Zhang // *J. Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*. 2010. **11**. N 10. P. 812.
6. Chen J.-J., Jiang J.-Q. // *Food and Agricultural Immunology*. 2012. **24**. N 3. P. 331.
7. Zhaozhen Cao, Shengxin Lu, Jinting Liu, Jinhua Zhan, Meng Meng, Rimo Xi // *Analytical Letters*. 2011. **44**. N 6. P. 1100.
8. Zhaozhen Cao, Meng Meng, Shengxin Lu, Rimo Xi // *Analyt. Let.* 2011. **44**. N 6. P. 1077.
9. Els Van Coillie, Jan De Block, Wim Reybroeck // *J. Agric. Food Chem.* 2004. **52**. P. 4975.

Поступила в редакцию 30.01.14

DETERMINATION OF LEVOFLOXACIN (LEVOROTATORY STEREOISOMER OF OFLOXACIN) IN MILK BY INDIRECT ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

I.A. Shanin¹, Nguyen Thi Dieu Thuy³, S.A. Eremin^{1,2}

(¹*M.V. Lomonosov Moscow State University*; ²*I.M. Sechenov First Moscow State Medical University*; ³*Institute of Biotechnology Vietnamese Academy of Science and Technology*)

In this work we were obtained polyclonal antibodies for levofloxacin. We synthesize conjugates of levofloxacin with cationized BSA for immunization and with ovalbumin for development of ELISA for the detection of levofloxacin. The developed method is characterized by range of detectable concentrations of 0,03 ng/ml to 0,41 ng / mL, and the limit of detectable concentrations – 0,01 ng/ml. We tested the 28 fluoroquinolones for cross reactivity and only ofloxacin (145%), marbofloxacin (82%), ofloxacin dextrorotatory form (68%), rufloxacin (67%), garenoxacin (24%) has cross reactivity. Optimized ELISA technique allows the detection of levofloxacin in milk from 0,33 ng/ml to 3,34 ng/ml. The recoveries were in the range of 89,5–102% with a relative standard deviation of 3%. We tested 45 real samples of milk purchased in a local stores, for 5 of them result were positive (near 1 ng/ml).

Key words: ELISA, conjugate with protein, fluoroquinolones, ofloxacin, levofloxacin, milk.

Сведения об авторах: *Еремин Сергей Александрович* – профессор химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, докт. химических наук (saeremin@gmail.com); *Шанин Илья Александрович* – аспирант кафедры химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (numenog-08@mail.ru); *Нгуен Ту Диу Тхай* – докт. института биотехнологии Вьетнамской академии наук и технологий, Ханой, Вьетнам (ntdieuthuy2002@gmail.com).