УДК 577.29

Соловаров И.С. [1], Хаснатинов М.А. [1], Данчинова Г.А. [1], Ляпунов А.В. [1], Болотова Н.А. [1], Манзарова Э.Л. [1], Кондратов И.Г. [2], Беликов С.И. [2]

ОЦЕНКА ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ СВОЙСТВ ДНК-АПТАМЕРОВ И ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

[1] ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Иркутск, Россия
[2] ФГБУН Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

Была проведена работа по получению аптамеров к вирусу клещевого энцефалита, а также оценка их нейтрализующей активности. В качестве нейтрализующих агентов были использованы 2 аптамера и 2 субстрата из растений из Монголии. Кроме того, был поставлен эксперимент на возможности маскирования аптамерами вирусных частиц от нейтрализующих их антител. В результате один из экстрактов растений показал нейтрализующую активность по ингибированию инвазивности вируса клещевого энцефалита.

Ключевые слова: аптамеры, вирус клещевого энцефалита, бляшкообразующие единицы

ASSESSMENT OF NEUTRALIZING PROPERTIES OF DNA-APTAMERS AND EXTRACTS OF MEDICINAL HERBS AGAINST THE TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS

Solovarov I.S. [1], Khasnatinov M.A. [1], Danchinova G.A. [1], Liapunov A.V. [1], Bolotova N.A. [1], Manzarova E.L. [1], Kondratov I.G. [2], Belikov S.I. [2]

[1] Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia
[2] Limnological Institute of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

Tick borne encephalitis (TBE) is a dangerous neurological disease that is transmitted to humans through the bite of Ixodid ticks. The disease exhibits an estimated 16 000 cases recorded annually over 30 European and Asian countries. The agent of TBE is the tick borne encephalitis virus (TBEV), belonging to the family Flaviviridae, genus Flavivirus. In spite the significant impact of TBE on human health, there is a serious lack of specific treatment against this disease. The only specific drug available is the human anti-TBEV immunoglobulin from vaccinated blood donors. The drug is produced and used in Russia only, both to prevent and to cure the TBE.
In this work, we evaluated the ability of TBEV-specific DNA-aptamers and extracts of traditional medicine plants to neutralize the TBEV. Selection of aptamers was performed using SELEX approach. Extracts of the seeds of Momordica cochinchinensis and Terminalia chebula were produced by boiling the ground seeds in water, clarified by centrifugation and filtration steps and filter sterilized.
The SELEX had produced two aptamers – My13 and My38. Neither of two was capable to neutralize TBEV in vitro. The ability to shield the antibody binding sites on the surface of TBEV virions was also absent. The extract of M. cochinchinensis exhibited no neutralizing activity as well. Surprisingly, the T. chebula extract completely neutralized the TBEV after 30 min of incubation at 37 °C. The possible explanations and further development of the project are discussed.

Key words: aptamers, tick-borne encephalitis virus, plaque-forming units

Клещевой энцефалит – вирусная инфекция, являющаяся одной из самых опасных и распространённых природно-очаговых инфекций лесной зоны Евразийского континента. Данная инфекция характеризуется лихорадкой, интоксикацией с поражением серого вещества головного мозга и/или оболочек головного и спинного мозга. Заболевание может привести к неврологическим и психиатрическим осложнениям, а в некоторых случаях – даже к смерти больного [12]. Данный вирус принадлежит к семейству флавивирусов, в которое также входят вирус японского энцефалита, вирус жёлтой лихорадки, вирус Западного Нила и вирус Денге. Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) подразделяется на 3 субтипа: европейский, сибирский и дальневосточный [8]. В настоящее время не существует специфического антивирусного лечения для ВКЭ. Передача вируса в основном происходит посредством укуса клеща.

ВКЭ представлен одноцепочечной РНК, которая вместе с белком С формирует нуклеокапсид, а М и Е белки формируют оболочку вируса. Однако основным белком вируса, который постоянно экранирован на поверхности зрелой частицы вируса, является белок Е. Данный белок содержит антигеновые детерминанты, которые ответственны за гемагглютинацию и нейтрализацию, а также индуцирует протективную иммунную реакцию в носителе [2]. Ранее упомянутые субтипы ВКЭ не показывают значительных антигеновых различий между собой. Как было показано криоэлектронной микроскопией, зрелый вирус содержит 90 димеров белка Е [10]. Поскольку белок Е является ключом в слиянии вирусной частицы и клеточной мембраны, то представляется целесообразным поиск веществ, способных блокировать рецепторную и фьюжн-активность белка Е и за счёт этого ингибировать проникновение вирусных частиц в клетки хозяина.

Аптамерами называют короткие, как правило, 40–100 нуклеотидных оснований (н. о.), одноцепочечные олигонуклеотиды (ДНК или РНК), которые способны принимать уникальную вторичную структуру за счёт внутримолекулярных водородных связей. Образующиеся при этом структуры способны связывать чужеродные молекулы с высокой

аффинностью и специфичностью. Аптамеры могут быть получены с помощью метода систематической эволюции лигандов посредством экспоненциального обогащения (SELEX). Отбор аптамеров может проводиться на различных целевых объектах, начиная с небольших молекул, например, полипептидов, белков, токсинов, и заканчивая целыми клетками, тканями или даже организмами [6, 11]. В сравнении с антителами, аптамеры обладают рядом преимуществ. Во-первых, отбор аптамеров проводится *in vitro*. Данная особенность позволяет контролировать и модифицировать условия отбора, а также избегать влияния различных побочных веществ, участвующих в реакции. Отбор *in vitro* позволяет получать аптамеры к антигенам, к которым существуют сложности в получении антител. Во-вторых, время получения аптамеров может составлять от 3 дней до 2 недель [4], что существенно снижает временные затраты по их поиску. В-третьих, аптамеры производятся синтетическим путём, вследствие чего вариабельность различных партий лекарств на их основе должна быть минимальной. В-четвертых, в отличие от антител, аптамеры проявляют большую стабильность в широком диапазоне температур и условий хранения. В-пятых, аптамеры могут быть модифицированы с помощью различных функциональных групп. Это могут быть различные лекарственные молекулы, токсины, флуоресцентные красители и другие вещества [9]. Учитывая высокую аффинность ДНК- и РНК-аптамеров к целевым молекулам, они могут стать достойной заменой антител в биотехнологических и терапевтических приложениях [15]. В данной работе приведены результаты селекции ДНК-аптамеров, специфично связывающихся с антигеном ВКЭ. Кроме того, оценена их вирус-нейтрализующая активность, а также способность блокировать эпитопы белка Е ВКЭ, которые связываются со специфичными иммуноглобулинами. Для сравнительной оценки эффективности аптамеров, а также в целях поиска альтернативных противовирусных средств параллельно была проверена вируснейтрализующая активность водных экстрактов лекарственных растений – терминалии (*Terminalia chebula* Retz) и момордики (*Momordica cochinchinensis* (Lour) Spreng).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изолят ВКЭ 92М [1] наращивали в культуре клеток почки эмбриона свиньи СПЭВ в течение 4 суток. После этого культуральную среду осветляли центрифугированием при 13 400 об/мин в течение 10 мин и определяли концентрацию инфекционного ВКЭ в полученной вирусной суспензии с помощью титрования бляшкообразующих единиц (БОЕ) [7]. Для приготовления антигена ВКЭ 100–150 мкл вирусной суспензии наносили в лунки 8-луночных стрипов с иммобилизованными антителами к белку Е ВКЭ («Вектор-Бест», Новосибирск). Стрипы инкубировали в шейкер-инкубаторе при 4 °С в течение ночи, после чего инокулят удаляли, а лунки однократно промывали 200 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (pH = 7.4). Далее стрипы высушивали при комнатной температуре и хранили в герметичной упаковке при +4 °С до проведения отбора аптамеров.

В качестве исходного материала для селекции аптамеров использовали пул случайных олигонуклеотидов длиной 40 н. о., фланкированных участками распознавания праймеров AptF и AptR (табл. 1), которые использовались в полимеразной цепной реакции (ПЦР) для амплификации фракции аптамеров, специфично связавшихся с антигеном ВКЭ. Структура исходного пула аптамеров, праймеров и селектированных аптамеров приведена в таблице 1. Все синтетические олигонуклеотиды, использованные в работе, приобретены в ЗАО «Синтол» (Москва).

Пул аптамеров в количестве 1,5 мкл водного раствора (25 pM) денатурировали при 96 °С в течение 3 минут в 48,5 мкл буфере для инкубации (150 мМ KCl, 20 мМ Tris HCl; pH = 9), после чего смесь инкубировали в ледяной бане в течение 10 мин. Далее пул аптамеров наносили в лунку без антигена вируса, но с иммобилизованными антителами к ВКЭ для исключения аптамеров, связывающихся с подложкой и антителами на ней. После инкубации в течение 60 мин при комнатной температуре пул аптамеров переносили в лунку с иммобилизованным ВКЭ и инкубировали в течение 40 мин при комнатной температуре. После этого лунки 8 раз промывали 200 мкл буфера для инкубации. Далее связавшиеся аптамеры элюировали в течение 5 мин с поверхности антигена ВКЭ 50 мкл раствора 150 мМ KCl, 20 мМ Tris HCl (pH = 9). Далее 5 мкл элюата использовали в качестве матрицы в ПЦР на реал-тайм аплификаторе Rotor Gene Q (Qiagen). ПЦР проводилась до 26 циклов во избежание образования неспецифических продуктов реакции. Продукты ПЦР детектировали с помощью электрофореза в 6%-м акриламидном геле, окраску ампликонов проводили с помощью интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBR Green. Ампликоны длиной 80 н. о. вырезали, очищали и элюировали из геля, 5 мкл элюата с ампликоном использовали в качестве матрицы в неравновесной ПЦР с 10-кратным избытком праймера AptF, для синтеза одноцепочечных ДНК-аптамеров. Обогащённый таким образом пул аптамеров переосаждали этанолом в присутствии ацетата натрия (pH = 5.5). Затем аптамеры растворяли в 50 мкл буфера для инкубации и повторяли процедуру селекции сначала. Всего было проведено 14 раундов SELEX. После последнего раунда отбора двухцепочечные продукты лигировали в вектор pTZ57R/T (Thermo Fisher Scientific). Полученной конструкцией химически трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамм XL1 Blue и формировали библиотеку клонов для установления нуклеотидной последовательности вставки. Наиболее часто встречающиеся последовательности длиной 80 н. о. синтезировали (ЗАО «Синтол», Москва) и использовали в качестве ВКЭ-специфичных аптамеров в тестах нейтрализации ВКЭ и маскирования антигена ВКЭ. Кроме того, в качестве контроля был синтезирован аптамер TBE2R, описанный ранее Bruno et al [3] как обладающий высокой аффинностью к рекомбинантному белку Е ВКЭ (табл. 1).

Таблица 1

Названия и последовательности аптамеров и праймеров, использованных в работе

Название	Структура	Ссылка
Прямой праймер (AptF)	CTCCTCTGACTGTAACCACG	Данная работа
Обратный праймер (AptR)	GGCTTCTGGACTACCTATGC	Данная работа
Начальный пул аптамеров	CGTGGTTACAGTCAGAGGAG-(N_{40})-GCATAGGTAGTCCAGAAGCC	Данная работа
My13	GGCTTCTGGACTACCTATGCGTTCAACTTTTGCAGCAACAA AATACATACGGCATACTACCGTGGTTACAGTCAGAGGAG	Данная работа
My38	CTCCTCTGACTGTAACCACGGCACAATATAACTAAACATA ATTCGAACCCCTGACTGTAAGCATAGGTAGTCCAGAAGCC	Данная работа
TBE2R	ATCCGTCACACCTGCTCTGAGCGCTGACTGCCAACC CCTGATGGACTCCTGCGGTGGTGTTGGCTCCCGTAT	[3]

Препараты семян терминалии (*Terminalia chebula* Retz) и момордики (*Momordica cochinchinensis* (Lour) Spreng) были любезно предоставлены N. Oyuntsetseg (Монгольский государственный медицинский университет) в высушенном и измельчённом виде. Экстракты растительных препаратов приготавливали в виде 2%-го водного отвара (масса/объем) в соответствии с N. Oyuntsetseg et al. [16] и стерилизовали фильтрацией через 0,22 мкм фильтр.

ВКЭ 92М в количестве 20000 БОЕ в объёме 100 мкл смешивали с равным объемом тестируемого аптамера (в конечной концентрации 10 мкг/мл), 2%-го экстракта растений, человеческого иммуноглобулина (ФГУП «НПО «Микроген», Москва) в конечном разведении 1 : 80, или ФСБ (pH = 7.4). Смеси инкубировали при 37 °С в течение 30 мин и затем определяли концентрацию инфекционного ВКЭ в каждом образце с помощью титрования БОЕ.

В работе использовали процедуру маскирования, описанную Muharemagic et al. [14], с незначительными модификациями. В частности, 20000 БОЕ ВКЭ 92М ресуспендированного в объёме 100 мкл смешивали с равным объёмом аптамера (рабочая концентрация – 10 мкг/мл) либо с равным объемом ФСБ (pH = 7.4). Образцы инкубировали при 37 °С в течение 15 мин при 37 °С, а затем добавляли к каждому образцу 100 мкл иммуноглобулина человека против ВКЭ (рабочее разведение 1 : 120). Смеси инкубировали в течение 15 мин при 37 °С, после чего определяли концентрацию инфекционного ВКЭ в каждом образце с помощью титрования БОЕ.

Все эксперименты проводили в трех независимых повторах, результаты представляли в виде средних значений. Для оценки внутригрупповой вариабельности результатов рассчитывали стандартное отклонение. Моделирование вторичных структур проводили с помощью онлайн-сервиса университета Вены «RNAfold web server» (http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi). Обработку результатов производили с помощью программы MS Office Excel (Microsoft Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате отбора аптамеров, специфично связывавшихся с антигеном ВКЭ, в процедуре SELEX была получена библиотека из 112 клонов, содержащих вставку порядка 80 н. о. Определение нуклеотидных последовательностей показало, что наиболее часто встречаются 2 аптамера – My13 и My38 (табл. 1). Моделирование вторичных структур ДНК показало, что топология аптамера My13 была аналогична топологии аптамера TBE2R [3]. Все три аптамера были синтезированы и использованы для вирусологических экспериментов.

Результаты изучения вируснейтрализующей активности и маскирующего эффекта в отношении специфичного иммуноглобулина приведены на рисунке 1. Оказалось, что ни один из аптамеров, включая TBE2R, не обладает вирус-нейтрализующей активностью в отношении ВКЭ (рис. 1а). Также ни один из аптамеров не блокировал связывание иммуноглобулина с инфекционными вирионами – эффективность нейтрализации оставалась на уровне неблокированного ВКЭ (рис. 1б).

Экстракт момордики также не обладал противовирусной активностью. Однако экстракт *T. chebula* полностью нейтрализовал вирус во всех трех повторах эксперимента (рис. 1в). Настолько сильное действие неочищенного экстракта может объясняться как наличием в его составе химических компонентов, обладающих специфическим противовирусным действием на ВКЭ, так и неспецифическим ингибированием вируса за счет химико-физических свойств экстракта. Для выяснения реальных механизмов нейтрализации ВКЭ экстрактом *T. chebula* необходимы детальные исследования этого эффекта.

В заключение можно сделать вывод, что, несмотря на отсутствие прямого противовирусного действия аптамеров, необходимо дальнейшее изучение их взаимодействия с поверхностными белками ВКЭ. В частности, неизвестно, с каким именно компонентом антигена ВКЭ связывались селектированные аптамеры в ходе SELEXа. Также не ясно, какова была аффинность и специфичность этой связи и возможно ли использовать полученные аптамеры в качестве бакенов для детекции ВКЭ или специфичных целеуказателей для направленной доставки других противовирусных средств к вирусным частицам.

Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП «ПЦР-диагностика» ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека».

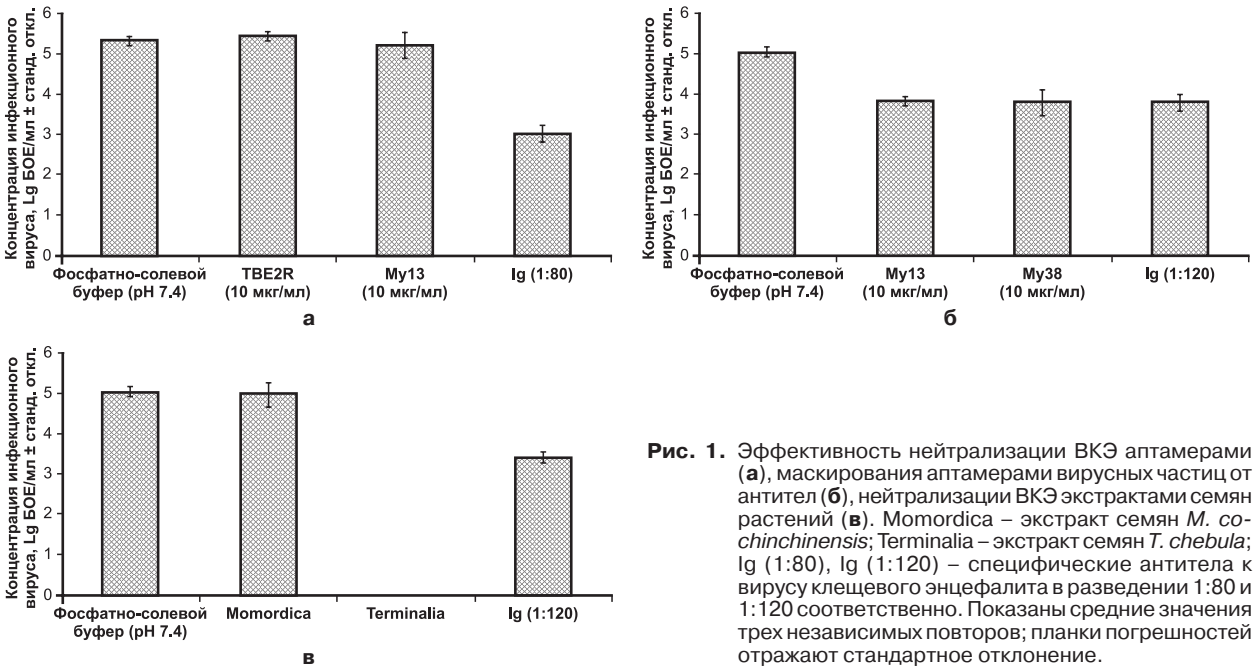

Рис. 1. Эффективность нейтрализации ВКЭ аптамерами (**а**), маскирования аптамерами вирусных частиц от антител (**б**), нейтрализации ВКЭ экстрактами семян растений (**в**). Momordica – экстракт семян *M. cochinchinensis*; Terminalia – экстракт семян *T. chebula*; Ig (1:80), Ig (1:120) – специфические антитела к вирусу клещевого энцефалита в разведении 1:80 и 1:120 соответственно. Показаны средние значения трех независимых повторов; планки погрешностей отражают стандартное отклонение.

ЛИТЕРАТУРА
REFERENCES

1. Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А., Злобин В.И., Ляпунов А.В., Арбатская Е.В., Чапоргина Е.А., Абмэд Д., Батаа Ж., Цэрэнноров Д., Отгонбаатар Д. Вирус клещевого энцефалита в Монголии // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2012. – Т. 111, № 4. – С. 9–12.

Khasnatinov MA, Danchinova GA, Zlobin VI, Liapunov AV, Arbatskaya EV, Chaporgina EA, Abmed D, Bataa Z, Tserennorov D, Otgonbaatar D. (2012). Tick-borne encephalitis virus in Mongolia [Virus kleshchevogo entsefalita v Mongolii]. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)*, 111 (4), 9-12.

2. Bressanelli S, Stiasny K, Allison SL, Stura EA, Duquerroy S, Lescar J, Heinz FX, Rey FA. (2001). Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J.*, 23, 728-738.

3. Bruno JG, Carrillo MP, Richarte AM, Phillips T, Andrews C, Lee JS. (2012). Development, screening, and analysis of DNA aptamer libraries potentially useful for diagnosis and passive immunity of arboviruses. *BMC Res. Notes*, 5 (1), Article 633, 1-12.

4. Cox JC, Ellington AD. (2001). Automated selection of anti-protein aptamers. *Bioorg. Med. Chem.*, 9 (10), 2525-2531.

5. Dumpis U, Crook D, Oksi J. (1999). Tick-borne encephalitis. *Clin. Infect. Dis.*, 28 (4), 882-890.

6. Ellington AE, Szostak JW. (1990). *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346, 818-822.

7. Gould EA, Clegg JCS. (1985). Growth, titration and purification of togaviruses. *Virology: A Practical Approach* (Mahy BWJ, ed.). Oxford, 43-48.

8. Gubler DJ, Kuno G, Markoff L. (2007). Flaviviruses. *Fields virology* (Knipe DM, Howley PM, Griffin D, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, eds.), 1153-1252.

9. Jayasena SD. (1999). Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin. Chem.*, 45 (9), 1628-1650.

10. Kaufmann B, Rossmann MG. (2010). Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. *Microbes Infect.*, 13, 1-9.

11. Kong HY, Byun J. (2013). Nucleic acid aptamers: new methods for selection, stabilization, and application in biomedical science. *Biomol. Ther.*, 21 (6), 423-434.

12. Lindquist L, Vapalahti O. (2008). Tick-borne encephalitis. *Lancet,* 371, 1861-1871.

13. Mansfield KL, Johnson N, Phipps LP, Stephenson JR, Fooks AR, Solomon T. (2009). Tick-borne encephalitis virus – a review of an emerging zoonosis. *J. Gen. Virol.*, 90, 1781-1794.

14. Muharemagic D, Zamay A, Ghobadloo SM, Evgin L, Savitskaya A, Bell JC, Berezovski MV. (2014). Aptamer-facilitated protection of oncolytic virus from neutralizing antibodies. *Mol. Ther. Nucleic Acids,* 3 (3), e167. doi:10.1038/mtna.2014.19.

15. Neves MA, Reinstein O, Saad M, Johnson PE (2010). Defining the secondary structural requirements of a cocaine-binding aptamer by a thermodynamic and mutation study. *Biophys. Chem.*, 153 (1), 9-16.

16. Oyuntsetseg N, Khasnatinov MA, Mol-or-Erdene P, Oyunbileg J, Liapunov AV, Danchinova GA, Oldokh S, Baigalmaa J, Chimedragchaa Ch. (2014). Evaluation of direct antiviral activity of the DEVA-5 herb formulation and extracts of five Asian plants against influenza a virus H3N8. *BMC Complement. Altern. Med.*, 14, 235.

Сведения об авторах
Information about the authors

Соловаров Иннокентий Сергеевич – младший научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел.: (3952) 33-39-71; e-mail: keschass@mail.ru)
Solovarov Innokentiy Sergeevich – Junior Research Officer at the Laboratory of Arthropod-Borne Infections of Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (664003, Irkutsk, Timiryazev str., 16; tel.: (3952) 33-39-71; e-mail: keschass@mail.ru)

Хаснатинов Максим Анатольевич – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (e-mail: khasnatinov@yandex.ru)
Khasnatinov Maxim Anatolyevich – Candidate of Biological Sciences, Leading Research Officer at the Laboratory of Arthropod-Borne Infections of Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (e-mail: khasnatinov@yandex.ru)

Данчинова Галина Анатольевна – доктор биологических наук, руководитель лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (e-mail: dan-chin@yandex.ru)
Danchinova Galina Anatolyevna – Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Arthropod-Borne Infections of Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (e-mail: dan-chin@yandex.ru)

Ляпунов Александр Валерьевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (e-mail: liapunov.asp@mail.ru)
Liapunov Alexander Valeryevich – Candidate of Biological Sciences, Senior Research Officer at the Laboratory of Arthropod-Borne Infections of Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (e-mail: liapunov.asp@mail.ru)

Болотова Наталья Андреевна – младший научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (e-mail: nataly2193@mail.ru)
Bolotova Natalia Andreevna – Junior Research Officer at the Laboratory of Arthropod-Borne Infections of Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (e-mail: nataly2193@mail.ru)

Манзарова Эллина Лопсоновна – лаборант-исследователь лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (e-mail: manzarova89@yandex.ru)
Manzarova Ellina Lopsonovna – Clinical Research Assistant at the Laboratory of Arthropod-Borne Infections of Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (e-mail: manzarova89@yandex.ru)

Кондратов Илья Геннадьевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории аналитической биоорганической химии Лимнологического института Сибирского отделения Российской академии наук (664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3; тел. (3952) 51-18-74; e-mail: igkondratov@rambler.ru)
Kondratov Ilya Gennadyevich – Candidate of Biological Sciences, Senior Research Officer at the Laboratory of Analytical Biochemistry of Limnological Institute of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (664033, Irkutsk, Ulan-Batorskaya str., 3; tel. (3952) 51-18-74; e-mail: igkondratov@rambler.ru)

Беликов Сергей Иванович – доктор биологических наук, руководитель лаборатории аналитической биоорганической химии Лимнологического института Сибирского отделения Российской академии наук (e-mail: sergeibelikov47@gmail.ru)
Belikov Sergey Ivanovich – Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Analytical Biochemistry of Limnological Institute of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (e-mail: sergeibelikov47@gmail.ru)