

УДК 57.085.23

НОВАЯ СИСТЕМА ДОСТАВКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В КЛЕТКИ НА ОСНОВЕ ОЛИГОЭФИРПОЛИОЛА

*А.Г. Иксанова, А.Н. Фаттахова, Л.Р. Габитова,
Е.В. Малофеева, Л.Л. Щербина, И.И. Салафутдинов, А.Д. Стрельник,
Т.И. Абдуллин, Ю.Г. Штырлин*

Аннотация

Предложена новая система доставки биологически активных веществ в живые клетки на основе олигоэфирполиола ПЭ-240. В присутствии ПЭ-240 наблюдается значительное увеличение скорости внутриклеточного транспорта различных модельных соединений в эукариотические клетки. По данным флуоресцентной микроскопии введение в среду ПЭ-240 в концентрации 0.001–2 мг/мл приводит к заметному увеличению поглощения родамина 6G и доксорубина клетками линии *HeLa*. Сходный эффект наблюдается для транспорта сульфаниловых производных пиридоксина в клетки дрожжей *R. glutinis*. При этом скорость внутриклеточного транспорта зависит как от гидрофильно-липофильных свойств соединений, так и от особенностей строения клеточной стенки дрожжей. Результаты показывают, что ПЭ-240 обеспечивает более эффективную внутриклеточную доставку веществ на фоне ближайших аналогов – блоксополимеров окисей этилена и пропилена (Плуроники L-61, L-121, F-127). Важным достоинством новой системы доставки является значительно меньшая цитотоксичность по сравнению с Плурониками.

Ключевые слова: доставка лекарств, амфифильные полимеры, Плуроники, культуры клеток.

Введение

Разработка лекарственных средств нового поколения, обладающих высокой терапевтической эффективностью, избирательностью действия и низкой токсичностью, является приоритетной задачей, стоящей перед химиками, биологами и медиками всего мира. Наряду с традиционным подходом, основанным на идентификации и синтезе новых физиологически активных веществ, обычно называемых соединениями-лидерами, в последние годы все большее внимание уделяется методам полимерной терапии. К настоящему времени сконструировано достаточно большое количество лекарственных препаратов, в состав которых входят известные активные субстанции и различные полимеры-носители природного и синтетического происхождения [1]. Многообещающей платформой для доставки активных субстанций являются амфифильные полимеры, из которых наиболее известны блоксополимеры под торговой маркой Pluronic[®] (Плуроники) [2].

Плуроники представляют собой блоксополимеры этиленоксида (ЭО) и пропиленоксида (ПО) с общей формулой: $(\text{ЭО})_{n/2}-(\text{ПО})_m-(\text{ЭО})_{n/2}$. Варьируя соотношение блоков ЭО и ПО и молекулярную массу, удалось получить широкий ряд

полимеров, различающихся по своим физико-химическим характеристикам (гидрофильно-липофильному балансу (ГЛБ), критической концентрации мицеллообразования (ККМ), температурой в «точке помутнения» и др.). Установлено, что Плуроники обладают целым рядом полезных биологических свойств как в концентрациях ниже ККМ, так и в мицеллярной форме [1]. Предполагаемый механизм действия Плуроников основан на их способности дестабилизировать фосфолипидный бислой, уменьшать микровязкость мембраны и ингибировать АТФазную активность мембранных транспортеров в опухолевых клетках с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Проникая внутрь клетки, Плуроники воздействуют на мембраны митохондрий, что приводит к инициации апоптоза и сопровождается понижением уровня выработки АТФ, выходом из митохондрий цитохрома С и увеличением уровня активных форм кислорода в цитоплазме. Блоксополимеры окисей этилена и пропилена увеличивают проапоптотную передачу сигналов и уменьшают антиапоптотную защиту в клетках с МЛУ [3], ингибируют глутатион S-трансферазную детоксикационную систему [4]; нарушают лекарственную изоляцию в эндосомах [5].

В настоящее время ряд композиций Плуроников с различными активными субстанциями проходят I–III фазы клинических испытаний [6]. Несмотря на очевидный прогресс полимерной терапии Плуроников, следует отметить и ее весьма серьезные недостатки: узкий диапазон терапевтических доз и относительно высокая токсичность блоксополимеров (максимально переносимая доза для Плуроника L-61 составляет 0.1 г/кг, а LD₅₀ – 0.8 г/кг) [7]. По этой причине поиск новых высокоэффективных и безопасных систем доставки по-прежнему остается актуальной задачей современной полимерной терапии.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании новой системы доставки биологически активных веществ в клетки – олигоэфирполиола ПЭ-240, представляющего собой продукт алкоголятной полимеризации алкиленоксида [8]. При этом планировалось решить три основные задачи: 1) оценить влияние олигоэфирполиола ПЭ-240 на внутриклеточный транспорт различных модельных соединений в эукариотические клетки на примере клеток *HeLa* и клеток дрожжей *R. glutinis*; 2) провести сопоставительный анализ транспортных характеристик ПЭ-240 на фоне Плуроников L-61, L-121 и F-127; 3) выявить цитотоксичность ПЭ-240 в сопоставлении с Плурониками на примере L-61.

1. Материалы и методы

1.1. Реактивы. Плуроники L-61, L-121 и F-127, а также родамин 6G поставлены Sigma-Aldrich (США). Использовали доксорубин гидрохлорид (ЗАО «Брынцалов-А», Россия). Полиэфир ПЭ-240 синтезирован по методике, описанной в [8]. Модельные соединения (I и II), представляющие собой производные пиридоксина с хромофорным фрагментом, получены по следующим методикам.

1.1.1. Получение *n*-[3,4-дигидроксиметил-5-гидрокси-6-метилпиридил-2-азо]фенилсульфокислоты натриевой соли (I). Соединение I получено по методике [9]. Выход 95%. Т. пл. 200–201 °С. ЯМР ¹H (300 МГц, ДМСО-d₆): δ 2.07 (с, CH₃, 3 H); 4.96 (с, CH₂, 2H); 5.04 (с, CH₂, 2 H); 7.87, 7.78 (AB, ³J_{HH} = 7.5 Гц, 4H) Найдено, %: С 42.12; Н 3.84; N 10.06. C₁₄H₁₆N₃O₇S₂Na. Вычислено, %: С 42.75; Н 4.10; N 10.68.

1.1.2. Получение *n*-(1,5-Дигидро-3,3,8-триметил-9-гидрокси-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридинил-6-азо)фенилсульфокислоты натриевой соли (II). В колбе на 50 мл готовили раствор диазосоединения из 0.87 г (0.005 моль) сульфаниловой кислоты, 0.35 г (0.005 моль) нитрита натрия в 50 мл (0.01 моль) 0.2 н соляной кислоты при температуре 0–5 °С. Отдельно готовили раствор 0.005 моль 1,5-дигидро-3,3,8-триметил-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридин-9-ола и 0.86 г (0.015 моль) гидроокиси калия в 15 мл воды. К раствору фенолята ацетала по каплям при перемешивании и охлаждении до 0–5 °С добавили раствор диазосоединения. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 30 мин и нейтрализовали разбавленной соляной кислотой до pH 7.5. Нейтрализованную реакционную массу сушили в вакууме досуха, продукт перекристаллизовали из этилового спирта. Выход 70%. Т. разл. 239–240 °С. ЯМР ¹H (300 МГц, ДМСО-d₆): δ 1.51 (с, 2CH₃, 6H); 2.25 (с, CH₃, 3H); 4.79 (с, CH₂, 2H); 5.32 (с, CH₂, 2H); 7.69, 7.71 (AB-квартет, ³J = 8.94 Гц, C₆H₄, 4H). Вычислено C₁₇H₂₁N₃Na₂O₈S: С 43.13; Н 4.47; N 8.80. Найдено: С 42.03; Н 3.61; N 8.50.

Спектры ЯМР ¹H зарегистрированы на приборе Varian Unity-300 (300 МГц). Данные элементного анализа получены на приборе Perkin Elmer 2400 Series II. Контроль за ходом реакций и чистотой соединений проводили методом ТСХ на пластинах Silufol UV-254. Препаративную хроматографию соединений проводили на силикагеле КСКГ фр. 0.10-0.16 («Экофарм»).

1.2. Культивирование клеток *HeLa*. Клетки карциномы эндометрия человека (*HeLa*) культивировали в среде DMEM с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки, пенициллина (50 ед./мл) и стрептомицина (50 мкг/мл) в атмосфере 5%-ного CO₂ при 37 °С. Для получения клеточной суспензии монослой клеток трипсинизировали с последующей инактивацией трипсина добавлением среды DMEM с сывороткой. Далее клетки осаждали центрифугированием 500 g. Осадок ресуспендировали в ФСБ. Жизнеспособность клеток, оцененная посредством окрашивания трипановым синим, составляла более 90%.

1.3. Исследование транспорта флуорофоров в клетки *HeLa* в присутствии ПЭ-240. Суспензию клеток *HeLa* (0.7 млн./мл) в составе реакционной смеси инкубировали в присутствии полимеров ПЭ-240, Плуронинов L-61 и F-127 (1 мкг/мл – 2 мг/мл) при 37 °С в течение 10 мин. Далее добавляли 5·10⁻⁵ М родамина 6G или 1.5·10⁻⁵ М доксорубицина гидрохлорид и инкубировали в тех же условиях 20 мин. После инкубации клетки осаждали и дважды отмывали от остатка флуорофоров посредством центрифугирования в ФСБ течение 5 мин при 500 g. Регистрировали флуоресценцию накопленного клетками доксорубицина и родамина 6G на микроскопе Carl Zeiss Axio Scope A1. Количество анализируемых клеток в каждом эксперименте составляло не менее 200 клеток. Интенсивность флуоресценции отдельных клеток оценивали с помощью программы TriTek CometScoreTMFreeware v1.5 [10]. Из интенсивности свечения клеток в опыте вычитали фоновое свечение необработанных флуорофором клеток. Эффективность транспорта флуорофоров оценивали по удельной интенсивности флуоресценции (*I*), рассчитываемой по следующей формуле:

$$I = I_{\text{общ}} / n,$$

где I – удельная интенсивность свечения, $I_{\text{общ}}$ – суммарная интенсивность флуоресценции доксорубина в исследуемых клетках, n – количество клеток.

1.4. Культивирование дрожжей. Дрожжи *Rhodotorula glutinis* любезно предоставлены музеем кафедры почвоведения биолого-почвенного факультета Московского государственного университета. Дрожжи культивировали на агаризованной среде Сабуро. Суспензию дрожжей из среды Сабуро переносили в ФСБ и отмывали от остатка среды центрифугированием в течение 15 мин при 1000 g (4 °C). Клетки суспендировали в ФСБ сразу после отмывки (интактные клетки) или дополнительно выдерживали в дистиллированной воде двое суток при 4 °C для получения клеток с нарушенной клеточной стенкой [11, с. 23–26]. Жизнеспособность дрожжей, оцененная посредством окрашивания трипановым синим, составляла более 90%.

1.5. Исследование динамики поглощения хромофоров дрожжевыми клетками в присутствии ПЭ-240. Клетки дрожжей (6 млн./мл) инкубировали в ФСБ в присутствии полимеров ПЭ-240, L-61 или L-121 в концентрации 100 мкг/мл при 37 °C в течение 10 мин. Далее добавляли 10^{-4} М соединений (I или II) и инкубировали в тех же условиях 60 мин.

После инкубации дрожжи осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 1000 g. Вычисляли остаточную концентрацию исследуемых соединений в супернатанте, регистрируя оптическое поглощение при $\lambda_{\text{max}} = 450$ нм. Коэффициенты экстинкции I и II составляют 13516 и 10763 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ соответственно.

1.6. Исследование цитотоксичности полимеров. Цитотоксичность полимеров на культуре клеток *HeLa* оценивали с использованием пролиферативного MTS-теста (Promega). Клетки (5 тыс. клеток в лунке) культивировали в 100 мкл среды DMEM в стандартных условиях в присутствии полимеров и без полимеров (контроль) в течение 2 дней. Далее клетки промывали ФСБ, добавляли 100 мкл среды DMEM с MTS/PMS и инкубировали в стандартных условиях 4 ч. Количество жизнеспособных клеток оценивали по оптическому поглощению продукта метаболического восстановления MTS (фармазана) при 495 нм на микропланшетном фотометре Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США).

1.7. Статистический анализ. Результаты представлены медианами, для описания разброса использовали 2.5%-ный перцентиль и 97.5%-ный перцентиль. Достоверность различий между вариантами оценивали с помощью критериев Крускала – Уоллиса и Дана ($P < 0.05$) [12, с. 30–31].

2. Результаты и обсуждение

2.1. Транспорт флуорофоров в клетки *HeLa*. Влияние ПЭ-240 на транспорт модельных флуорофоров (родамина 6G и доксорубина) в клетки человека оценивали на культуре клеток *HeLa*. Установлено, что ПЭ-240 существенно увеличивает поглощение родамина 6G клетками уже в концентрации 10 мкг/мл в начальный период времени до 15 мин инкубации (рис. 1).

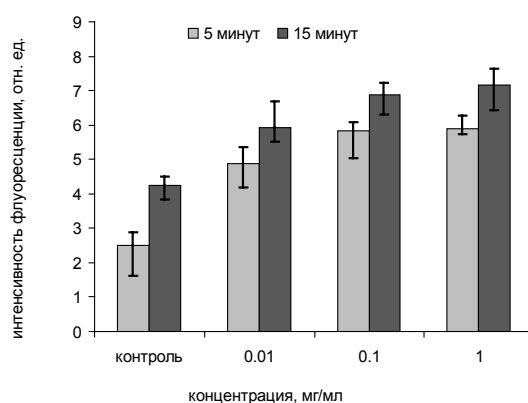


Рис. 1. Удельная интенсивность флуоресценции родамина 6G в клетках *HeLa* в присутствии ПЭ-240. Концентрация родамина $5 \cdot 10^{-5}$ М

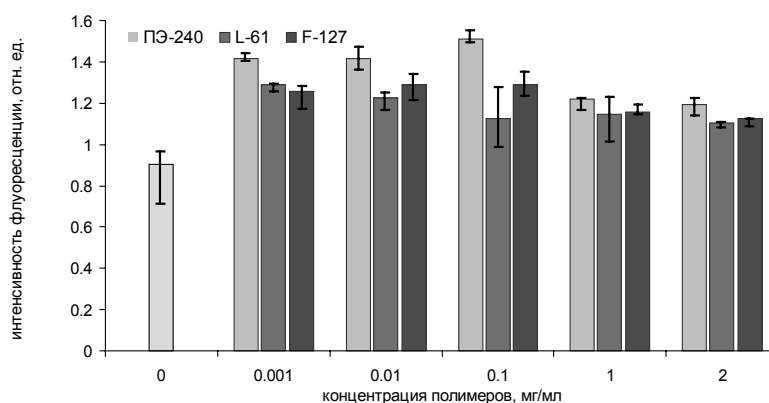


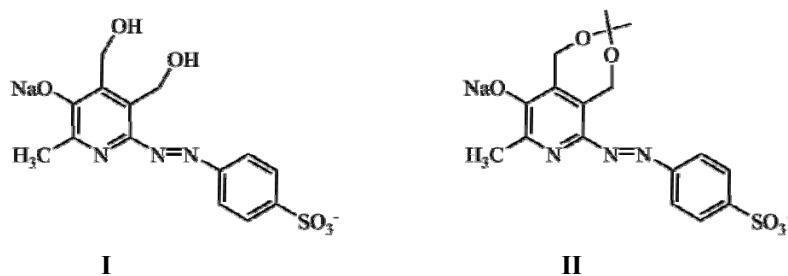
Рис. 2. Удельная интенсивность флуоресценции доксорубина в клетках *HeLa* после их обработки ПЭ-240 или Плурониками

При введении ПЭ-240 в широком диапазоне концентраций (0.001–2 мг/мл) во всех случаях наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции доксорубина в клетках, превышающее контрольное значение в 1.3–1.6 раза (рис. 2). При этом зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации полимера является нелинейной и достигает максимального значения при концентрации ПЭ-240 100 мкг/мл. В то же время Плуроники L-61 и F-127 в том же диапазоне концентраций оказывают заметно меньшее влияние (интенсивность флуоресценции увеличивается на 10–30%), и отчетливой зависимости от концентрации полимеров (выше и ниже ККМ [2]) не прослеживается.

2.2. Динамика поглощения соединений I и II дрожжевыми клетками.

С целью оценки транспортных свойств ПЭ-240 в опытах с дрожжевыми клетками *R. glutinis* нами были синтезированы модельные соединения I и II, содержащие в своем составе хромофорную азагруппу с характерной полосой поглощения в области 430–460 нм. Следует отметить, что полученные соединения различаются и по своим липофильным характеристикам (соединение II по

сравнению с соединением **I** является более липофильным за счет ацетонидной защиты гидроксиметильных групп в 3-м и 4-м положениях пиридинового цикла):



Установлено, что ПЭ-240 в концентрации 100 мкг/мл увеличивает скорость поглощения соединения **I** интактными клетками дрожжей почти в 4 раза, в то время как скорость поглощения более липофильного соединения **II** увеличивается незначительно (рис. 3). При переходе к клеткам с нарушенной клеточной стенкой наблюдается иная картина: ПЭ-240 в той же концентрации оказывает примерно одинаковое влияние на транспорт как гидрофильного соединения **I**, так и более гидрофобного соединения **II** (рис. 4).

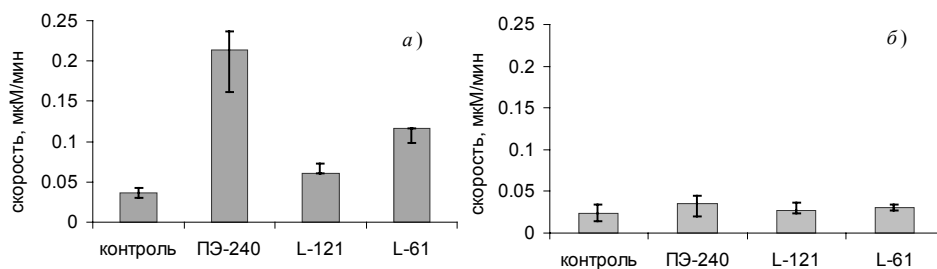


Рис. 3. Скорость поглощения соединения **I** (a) и соединения **II** (б) интактными клетками дрожжей *R. glutinis* в присутствии полимеров. Концентрации хромофоров и полимеров составляли 10^{-4} М и 100 мкг/мл соответственно. Концентрация клеток 6 млн./мл. $P < 0.05$

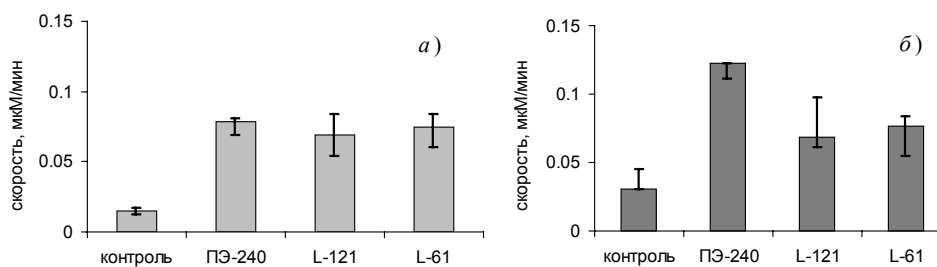


Рис. 4. Скорость поглощения соединения **I** (a) и соединения **II** (б) клетками дрожжей *R. glutinis* с поврежденной клеточной стенкой в присутствии полимеров. Концентрации хромофоров и полимеров составляли 10^{-4} М и 100 мкг/мл соответственно. Концентрация клеток 6 млн./мл. $P < 0.05$

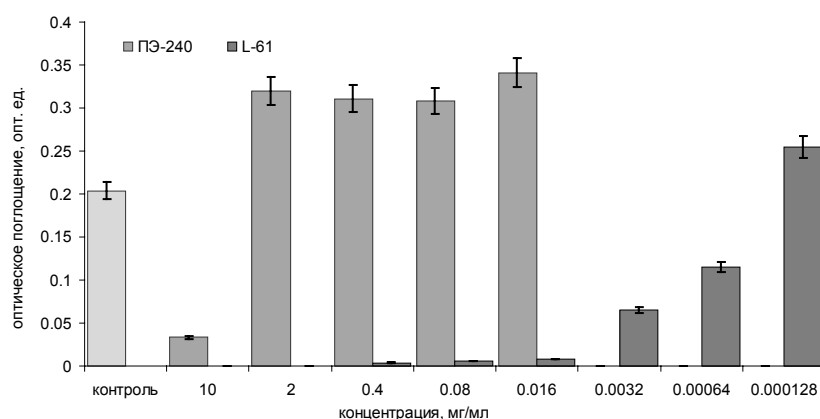


Рис. 5. Цитотоксичность ПЭ-240 (16 мкг/мл – 10 мг/мл) и Плуроника L-61 (0.13 мкг/мл – 0.4 мг/мл) на клетках *HeLa* (MTS-тест)

Мы полагаем, что наблюдаемые эффекты связаны с особенностями взаимодействия модельных соединений с олигоэфирполиолом и полисахаридными фрагментами клеточной стенки дрожжей. В случае соединения **I** возможно образование нековалентных конъюгатов за счет водородных связей с участием двух гидроксильных групп гидроксиметильных фрагментов и одной ароматической гидроксигруппы. В то же время для соединения **II** образование подобных конъюгатов представляется значительно менее вероятным.

Важно отметить, что во всех опытах олигоэфирполиол ПЭ-240 проявляет значительно более высокую активность в сравнении с Плурониками L-61 и L-121.

2.3. Цитотоксичность ПЭ-240 и Плуроника L-61. Результаты исследования цитотоксичности полимеров на культуре клеток *HeLa* с использованием пролиферативного MTS-теста приведены на рис. 5.

ПЭ-240 не проявляет цитотоксичности вплоть до концентрации 2 мг/мл, тогда как Плуроник L-61 снижает жизнеспособность клеток уже в концентрации около 0.64 мкг/мл, ингибируя рост клеток в 1.8 раза по сравнению с контролем (рис. 5). Результаты показывают, что Плуроник L-61 значительно более токсичен для клеток по сравнению с ПЭ-240 (почти на 3 порядка), что, очевидно, обусловлено высокой гидрофобностью Плуроника L-61 (ГЛБ = 3) и, как следствие, вызываемой им дестабилизацией клеточных мембран.

Заключение

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать следующие выводы.

1. Олигоэфирполиол ПЭ-240 оказывает существенное влияние на внутриклеточный транспорт различных модельных соединений в эукариотические клетки *HeLa* и *R. glutinis*.

2. Олигоэфирполиол ПЭ-240 является значительно более активным по сравнению с Плурониками L-61, L-121 и F-127.

3. В отличие от Плуроника L-61, предложенного в качестве перспективного полимерного носителя активных субстанций, ПЭ-240 значительно менее токсичен для клеток.

Принимая во внимание структурное сходство Плуроники и ПЭ-240, можно предположить, что влияние ПЭ-240 на внутриклеточный транспорт различных соединений обусловлено аналогичной способностью полимера к взаимодействию с фосфолипидной цитоплазматической мембраной [1]. Не исключено, что механизм действия связан с уменьшением микровязкости мембраны и/или со специфической способностью ПЭ-240 к ингибированию АТФ-зависимых транспортных систем клетки.

Summary

A.G. Iksanova, A.N. Fattakhova, L.R. Gabitova, E.V. Malofeeva, L.L. Shcherbina, I.I. Salafutdinov, A.D. Strel'nik, T.I. Abdullin, Yu.G. Shtyrlin. New Oligoether Polyol Based System for Delivery of Biologically Active Substances into Living Cells.

The work suggests a new oligoether polyol (PE-240) based system for the delivery of biologically active substances into living cells. PE-240 was found to substantially promote the intracellular accumulation of different low molecular weight compounds by eukaryotic cells. PE-240 increased the uptake of rhodamine 6G and doxorubicin by *HeLa* cells at PE-240 concentration as low as 1 µg/ml in the medium as revealed by fluorescent microscopy. Similar effect was observed for the transport of sulfanilic acid derivatives of pyridoxine into *R. glutinis* cells. Specifically, the uptake rate clearly depended on both hydrophilic-lipophilic properties of the compounds and the structure of the yeast cell wall. PE-240 provided more efficient intracellular transport of the compounds compared to its closest analogs like triblock copolymers of ethylene oxide and propylene oxide (Pluronic L-61, L-121, and F-127). Furthermore, PE-240 exhibited almost three orders of magnitude less cytotoxicity than Pluronic L-61.

Key words: drug delivery, amphiphilic polymers, Pluronic, cell cultures.

Литература

1. *Kabanov A.V.* Polymer genomics: An insight into pharmacology and toxicology of nanomedicines // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2006. – V. 58, No 15. – P. 1597–1621.
2. *Kabanov A.V., Batrakova E.V., Miller D.W.* Pluronic® block copolymers as modulators of drug efflux transporter activity in the blood-brain barrier // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2003. – V. 55, No 1. – P. 151–164.
3. *Batrakova E.V., Kabanov A.V.* Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers // *J. Control. Release.* – 2008. – V. 130, No 2. – P. 98–106.
4. *Batrakova E.V., Dorodnych T.Y., Klinskii E.Y., Kliushnenkova E.N., Shemchukova O.B., Goncharova O.N., Arjakov S.A., Alakhov V.Y., Kabanov A.V.* Anthracycline antibiotics non-covalently incorporated into the block copolymer micelles: in vivo evaluation of anti-cancer activity // *Br. J. Cancer.* – 1996. – V. 74. – P. 1545–1552.
5. *Venne A., Li S., Mandeville R., Kabanov A.V., Alakhov V.Y.* Hypersensitizing effect of pluronic L61 on cytotoxic activity, transport, and subcellular distribution of doxorubicin in multiple drug-resistant cells // *Cancer Res.* – 1996. – V. 56. – P. 3626–3629.
6. *Oerlemans C., Bult W., Bos M., Storm G., Nijssen J.F.W., Hennink W.E.* Polymeric Micelles in Anticancer Therapy: Targeting, Imaging and Triggered Release // *Pharm. Res.* – 2010. – V. 27. – P. 2569–2589.

7. RU2222776, МПК А 61 К9/107, 47/34, А 61 Р 35/00 А61К9/16. Композиции, включающие биологический агент / Кабанов А.В., Алахов В.Ю., Свешников П.Г., Северин Е.С. Патентообладатель: СУПРАТЕК ФАРМА, ИНК. (СА), Кабанов А.В. (RU). – Оpubл. 20.05.2001.
8. Штырлин Ю.Г., Сафина Г.Д., Федоренко В.Ю., Бадеев Ю.В., Климовицкий Е.Н., Насыбуллина Н.М., Залялютдинова Л.Н., Тудрий В.Д., Тудрий Г.А., Фаттахова А.Н., Абдуллин Т.И., Иксанова А.Г., Штырлин В.Г., Галкин В.И. Олигоэфирполиольный носитель для доставки активных веществ в живые клетки: Изобретение в режиме ноу-хау № 001/04/2010 КФУ.
9. Katritzky A. R., Kucharska H. Z., Tucker M. J., Wuest H. M. Arylazo derivatives of pyridoxine // J. Med. Chem. – 1966. – V. 9, No 4. – P. 620–622.
10. CometScore™Freeware v1.5. – 2003. – URL: http://www.autocomet.com/products_cometscore.php, свободный.
11. Шанхаев Э.Г. Дезинтеграция клеток в биотехнологии. – Улан-Удэ: Изд-во Вост.-сиб. техн. ун-та, 2001. – 94 с.
12. Акберова Н.И. Описательная статистика. Интервальные оценки: методическое руководство и сборник задач к практическим занятиям по курсу «Математические методы в биохимии». – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2003. – 40 с.

Поступила в редакцию
28.06.10

Иксанова Альфия Габдулахатовна – аспирант кафедры биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: alfiya_iksanova@mail.ru

Фаттахова Альфия Нурлимановна – кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: afattakh@rambler.ru

Габитова Линара Рустамовна – студент кафедры биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Малофеева Екатерина Викторовна – студент кафедры биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Щербина Лилия Леонидовна – студент кафедры биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Салафутдинов Ильнур Ильдусович – младший научный сотрудник кафедры генетики Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: sal.ilnur@gmail.com

Стрельник Алексей Дмитриевич – младший научный сотрудник отдела прикладной химии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: alexstrelnik@rambler.ru

Абдуллин Тимур Илдарович – кандидат биологических наук, ассистент кафедры биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: tabdulli@gmail.com

Штырлин Юрий Григорьевич – кандидат химических наук, зам. директора Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: yurii.shtyrlin@ksu.ru