

УДК 577.152.193.01

С.О. Козлов¹, И.В. Кудрявцев^{1,2}, Н.А. Грудинина¹, В.А. Костевич¹, О.М. Панасенко³,
А.В. Соколов^{1,3,4}, В.Б. Васильев^{1,4}

**АКТИВИРОВАННЫЕ НЕЙТРОФИЛЫ, ПРОДУЦИРУЮЩИЕ HOCl, ВЫЯВЛЯЮЩИЕСЯ
ПРИ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ И КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ
С ПОМОЩЬЮ ЦЕЛЕСТИНОВОГО СИНЕГО В**

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

² ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика
И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

HOCl образуется при стимуляции нейтрофилов благодаря активности миелопероксидазы. Для селективной спектрофотометрической детекции HOCl предложен целестиновый синий В (CB). Целью данной работы явилась разработка флуоресцентных методов оценки продукции HOCl нейтрофилами. Продукт реакции CB с HOCl флуоресцировал при 578 нм (возбуждение 487 нм). Методом конфокальной микроскопии получили изображения активированных нейтрофилов, окрашенных CB. При проточной цитометрии флуоресценция активированных 50 нМ PMA нейтрофилов была в 5 раз выше ($p < 0,05$), чем у клеток без активатора.

Ключевые слова: HOCl, хлорноватистая кислота, миелопероксидаза, целестиновый синий В, нейтрофилы, конфокальная микроскопия, проточная цитометрия, флуоресценция

**ACTIVATED PRODUCING HOCl NEUTROPHILS REVEALED BY FLOW CYTOMETRY
AND CONFOCAL MICROSCOPY WITH CELESTINE BLUE B**

S.O. Kozlov¹, I.V. Kudryavtsev^{1,2}, N.A. Grudinina¹, V.A. Kostevich^{1,3}, O.M. Panasenko³,
A.V. Sokolov^{1,3,4}, V.B. Vasilyev^{1,4}

¹ Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, Russia

² Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint-Petersburg, Russia

³ Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

⁴ Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

Hypochlorous acid (HOCl) is produced with myeloperoxidase (MPO) in activated neutrophils. To assay MPO activity we chose a HOCl-selective dye i.e. celestine blue B (CB) that changes into pink glycol after oxidation. Our aim was to elaborate fluorescent methods of measuring HOCl production with activated neutrophils. Scanning CB fluorescence before and after its reaction with HOCl revealed activation and maximum emission, at 487 and 578 nm respectively, which are specific for oxidized product. Activated with Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), the neutrophils were incubated with MPO inhibitor, 4-aminobenzoic acid hydrazide, which decreased fluorescence intensity (activation 487 nm, emission 578 nm) as compared with inhibitor-free samples. By confocal microscopy method we obtained images of CB- and DAPI-stained neutrophils. Neutrophil extracellular traps (NET) are clearly visible: DAPI staining of multiple DNA bands co-localizes with fluorescence of oxidized CB. Flow cytometry showed that intensity of neutrophils activated by 50 nM PMA was 5 times higher ($p < 0.05$) than in PMA-free cells.

Key words: HOCl, hypochlorous acid, myeloperoxidase, celestine blue B, neutrophil, confocal microscopy, flow cytometry, fluorescence

ВВЕДЕНИЕ

Нейтрофилы – самая многочисленная группа лейкоцитов (47–72 %), осуществляющая основные реакции врожденного иммунитета. Миелопероксидаза (МПО, К.Ф. 1.7.1.11, донор: H₂O₂-оксидоредуктаза) – фермент азурофильных гранул нейтрофилов – составляет около 5 % от общего белка этих клеток [1]. Активация нейтрофилов в ответ на провоспалительный стимул сопровождается сборкой НАДФН-оксидазного комплекса, который восстанавливает молекулярный кислород до супероксидного анион-радикала. Послед-

ний (спонтанно или с участием супероксиддисмутазы) превращается в пероксид водорода. МПО, образующая при реакции с пероксидом водорода высокореакционное соединение I, катализирует в ходе галогенирующего цикла образование хлорноватистой кислоты (HOCl) при двухэлектронном переносе на хлорид, либо в ходе пероксидазного цикла осуществляет последовательное одноэлектронное окисление субстратов, например, тирозина, урата, нитрита, аскорбата и др. Образование HOCl в ходе галогенирующего цикла лежит в основе антимикробной функции МПО и наряду с

другими механизмами врожденного иммунитета обеспечивает защиту организма от патогенов. Повышенная концентрация МПО, а также биомаркеров хлорирования (3-хлортирозин, 5-хлорурацил), зафиксирована при развитии окислительного/галогенирующего стресса, сопровождающего такие воспалительные заболевания, как инфаркт миокарда, ревматоидный артрит, почечная недостаточность, муковисцидоз и др. [1]. В настоящее время МПО рассматривается как мишень для новых противовоспалительных препаратов [7], для тестирования их активности необходимы доступные и чувствительные методы детекции синтеза НОСІ нейтрофилами.

За последние 10 лет предложен ряд веществ для детекции НОСІ с помощью флуоресцентных методов: 10-ацетил-3,7-дигидроксибензоксазин, аминофенилфлуоресцеин, дигидрорадамин и др. [3, 4, 5, 6]. Однако практически ни одно из предложенных веществ не является абсолютно специфичным к НОСІ, но что более важно, такие вещества, как правило, коммерчески недоступны и быстро разрушаются при хранении. Кроме того, следует отметить, что нейтрофилы содержат существенное количество таурина, который образует N-хлорамин таурина при реакции с НОСІ [9]. Хотя его окислительный потенциал еще достаточно высок, ряд флуоресцентных зондов, реагирующих с НОСІ, не реагируют с N-хлорамином таурина и поэтому не пригодны для оценки продукции НОСІ активированными нейтрофилами. Ранее для скрининга ингибиторов активности МПО нами был предложен кинетический спектрофотометрический метод измерения продукции НОСІ по окислению красителя целестинового синего В – С.І. 51050 (СВ) в присутствии таурина [8]. Было доказано, что СВ избирательно реагирует на действие НОСІ, окисляющей его до гликоля с переходом синей окраски в розовую. СВ не окислялся супероксидным анион-радикалом и пероксидом водорода. Было показано, что СВ реагирует с НОСІ и N-хлорамином таурина с высокими константами скорости – 25300 и $119000 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ соответственно. Ингибиторы активности МПО (церулоплазмин, гидразид 4-аминобензойной кислоты, салицилгидроксамовая кислота, 4-аминофенилсульфон, азид натрия) и антиоксиданты (скавенджеры НОСІ – цистеин, метионин, тиоцианат) подавляли окисление СВ в системе с очищенной МПО и в случае активации нейтрофилов [8]. В настоящей работе мы исследовали возможность использования СВ при конфокальной микроскопии и проточной цитометрии для оценки интенсивности синтеза НОСІ при активации нейтрофилов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали следующие реактивы: СВ, 4',6-диамидино-2-фенилиндо́л (DAPI), гидразид 4-аминобензойной кислоты (АВАН), глицерин, раствор гипохлорита натрия (1,78 М), раствор полилизина (0,1%-й), таурин, форбол-12-миристан-13-ацетат (РМА), ЭДТА («Sigma», США). Для приготовления растворов использовали апиrogenную деионизированную воду с удельным сопротивлением 18,2 Мом × см (Медиана-Фильтр, Россия). Измерение значений рН буферных растворов производили на портативном

рН-метре «Аквилон рН-410», точность измерения – 0,01 рН. Концентрированный раствор СВ (1 мМ) готовили в 20%-м водном глицерине (v/v), хранили при +4 °С без доступа прямого света.

Нейтрофилы выделяли из свежееотобранной донорской крови с 1,2 г/л ЭДТА (в качестве антикоагулянта) [2]. Эритроциты осаждали при комнатной температуре 3%-м раствором декстрана Т-500 в 0,85%-м NaCl (40 мл раствора на 100 мл крови). Плазму, обогащенную лейкоцитами и тромбоцитами, наслаивали на два слоя смеси фикола и урографина (плотности 1,077 и 1,089 г/л соответственно) в центрифужных пробирках. Фракцию гранулоцитов с примесью эритроцитов получали на второй интерфазе после центрифугирования (500 g, 30 мин) в градиенте плотности. После гипотонического лизиса эритроцитов в лизирующем буфере (114 мМ NH₄Cl, 7,5 мМ KHCO₃, 100 мкМ ЭДТА) клетки промывали 2 раза в PBS (буфер PBS: 1,058 мМ KH₂PO₄, 155,17 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 2,96 мМ Na₂HPO₄, рН 7,4) и ресуспендировали в D-PBS (буфер D-PBS: 0,489 мМ MgCl₂, 2,7 мМ KCl, 1,149 мМ K₂HPO₄, 137,9 мМ NaCl, 9,583 мМ NaH₂PO₄, рН 7,4) с глюкозой (1 г/л). Все эксперименты с нейтрофилами выполняли непосредственно в день отбора крови и проведения эксперимента.

Измерение интенсивности флуоресценции проводили с помощью планшетного флуориметра CLARIOStar (BMG LABTECH, Германия). Смешивали равные объемы СВ (2–200 мкМ) и НОСІ (2–50 мкМ) в PBS. Последовательно сканировали максимум возбуждения и максимум испускания СВ и продукта его окисления НОСІ. Выбранные максимумы (возбуждение 487 ± 5 нм, эмиссия 578 ± 10 нм) использовали для определения зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации НОСІ, добавленной к СВ. Нейтрофилы (10^5 клеток/мл) инкубировали при 37 °С в 96-луночном планшете при постоянном перемешивании (290 об./мин, Biosan, Латвия) в присутствии 20 мкМ СВ и без него, варьировали концентрацию РМА (0–200 нМ) в среде, содержащей 10 мМ фосфатного буфера, рН 7,4, 140 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 1 мМ CaCl₂, 0,5 мМ MgCl₂, 5 мМ D-глюкозы, 20 мМ таурина. Каждые 15 минут измеряли интенсивность флуоресценции проб (возбуждение 487 ± 5 нм, эмиссия 578 ± 10 нм).

Препараты нейтрофилов для исследования с помощью конфокальной микроскопии готовили следующим образом: покровные стекла (18 × 18 мм) инкубировали 1 час с 0,1%-м раствором полилизина, промывали водой и высушивали при комнатной температуре. Суспензию нейтрофилов (5×10^4 клеток/0,4 мл) с различными комбинациями СВ (20 мкМ), РМА (50 нМ) наносили на подготовленные стекла и инкубировали 30 минут при 37 °С. Аккуратно промывали PBS и фиксировали клетки 4%-м параформальдегидом (w/v) в PBS в течение 5 минут. Проводили окрашивание препаратов DAPI (0,36 мкМ) в течение 5 минут при комнатной температуре в темноте, промывали PBS и монтировали покровные стекла на предметные с помощью полимеризующейся смолы для флуоресцентной микроскопии (ДАКО). Изображения получали с использованием инверти-

рованного конфокального лазерного сканирующего микроскопа Carl Zeiss «LSM 510 META» (Carl Zeiss, Германия), с объективом Plan-Apochromat 20×/0,8 M27. Для возбуждения флуоресценции продукта окисления СВ использовали лазер с длиной волны 488 нм, для регистрации флуоресценции использовали фильтр > 505 нм, для возбуждения DAPI – 405 нм, для регистрации флуоресценции – 420–480 нм. Получение и обработку изображений осуществляли при помощи прилагаемого к микроскопу программного обеспечения.

Интенсивность флуоресценции нейтрофилов (возбуждение – 488 нм, 22 мВт, регистрация флуоресценции – 620 ± 30 нм) оценивали с помощью проточного цитометра Navious™ (Beckman Coulter). Нейтрофилы (10⁶ клеток/мл) инкубировали в течение 30 минут в присутствии 20 мкМ СВ и без него, в присутствии 50 нМ РМА и без него, в присутствии 50 мкМ АВАН и без него. Регистрировали 10000 клеток, полученные данные анализировали с помощью программы Kaluza Flow (Beckman Coulter).

Для статистической обработки экспериментальных данных использовали программу Microsoft Excel

2002. Эксперименты повторяли три раза ($n = 3$, если не указано иначе) и среднее значение рассчитывали как $X_m = (1/n)\sum X_i$, где X_i – значение, полученное в каждом опыте. Доверительные интервалы рассчитывали как $X_m \pm (\sigma / n^{1/2})t_{n-1, 1-\alpha/2}$, значения t (t-критерий Стьюдента) были взяты из табличных значений при условии, что $\alpha = 0,05$. Для проверки гипотезы о том, что анализируемая выборка имеет нормальное распределение, использовали критерий Колмогорова – Смирнова для $\alpha = 0,05$. Для оценки степени соответствия фактических и расчетных значений линейной зависимости вычисляли коэффициент детерминированности R² (нормированный от 0 до 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения максимума возбуждения и эмиссии СВ, окисленного НОСІ проводили последовательное сканирование в режиме изменения длины волны возбуждения от 420 до 520 нм при эмиссии в диапазоне от 550 до 610 нм. При этом продукт окисления СВ характеризовался максимумом возбуждения при 487 нм, подобного максимума не было зафиксировано в спектре неокисленного СВ (рис. 1а). Последующее

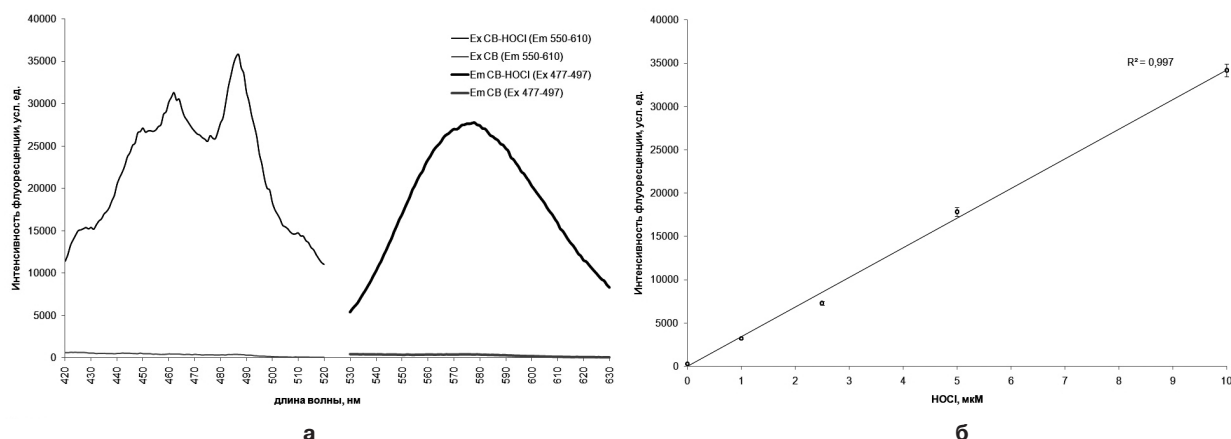


Рис. 1. Спектры возбуждения 420–520 нм (эмиссия 550–610 нм) 20 мкМ СВ (серая линия) и продукта реакции 20 мкМ СВ и 10 мкМ НОСІ (черная линия), спектры эмиссии 530–630 нм (возбуждение 477–497 нм) 20 мкМ СВ (жирная серая линия) и продукта реакции 20 мкМ СВ и 10 мкМ НОСІ (жирная черная линия) (а). Зависимость интенсивности флуоресценции (возбуждение 477–497 нм, эмиссия 558–598 нм) 20 мкМ СВ от концентрации НОСІ (б).

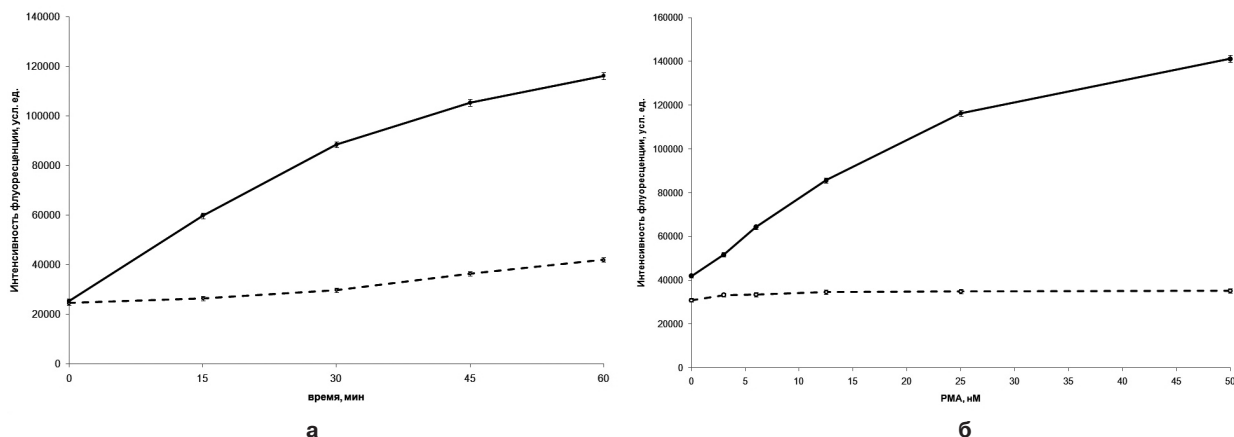


Рис. 2. Зависимость интенсивности флуоресценции продукта окисления СВ (возбуждение 477–497 нм, эмиссия 558–598 нм) от времени инкубации нейтрофилов (0–60 минут) с 25 нМ РМА (сплошная линия) и без него (пунктирная линия) (а), от концентрации активатора (0–50 нМ РМА) через 60 минут после начала активации нейтрофилов (сплошная линия), в том числе с ингибитором МПО (50 мкМ АВАН – пунктирная линия) (б).

сканирование максимума эмиссии при возбуждении светом с длиной волны 487 нм (± 5 нм) выявило широкий пик с максимумом 578 нм, отсутствующий в спектре эмиссии не окисленного СВ (рис. 1, а). Измерение интенсивности флуоресценции (возбуждение 487 ± 5 нм, эмиссия 578 ± 10 нм) серии растворов 20 мкМ СВ с добавлением НОСІ от 1 до 10 мкМ выявило линейную зависимость от концентрации НОСІ (рис. 1, б). Следует отметить, что флуоресценция, вызванная добавлением НОСІ до 1 мкМ, значимо отличалась ($p < 0,05$) от фоновой флуоресценции у неокисленного СВ. Инкубация нейтрофилов в среде с РМА и СВ приводила к увеличению флуоресценции окисленного СВ по мере увеличения времени инкубации и концентрации РМА (рис. 2, а, б). Суспензия нейтрофилов без добавления РМА характеризовалась фоновым увеличением флуоресценции, которая отсутствовала при инкубации клеток без СВ вне зависимости от присутствия активатора. Ингибитор активности МПО, АВАН снижал до фоновых значений интенсивность флуоресценции при стимуляции нейтрофилов РМА. Таким образом, был сделан вывод, согласующийся с ранее опубликованными данными, о том, что окисление СВ стимулированными нейтрофилами отражает продукцию ими НОСІ, обусловленную активностью МПО [8].

Изучение препаратов нейтрофилов с помощью конфокальной микроскопии показало, что клетки, находившиеся в среде без СВ, не обладают флуоресценцией, характерной для окисленного СВ. У нейтрофилов, инкубированных с СВ, но не активированных РМА, интенсивность флуоресценции была невелика. Известно, что при адгезии нейтрофилов на поверхность происходит их спонтанная активация (рис. 3, а). Контрольные опыты показали, что препарат СВ в концентрации 1 мМ не был токсичен для клеток, и в нём отсутствовали примеси липополисахарида

(данные не приведены). При инкубации нейтрофилов с РМА и СВ на препаратах были хорошо различимы локальные участки интенсивной флуоресценции. Как правило, они совпадали с тяжами ДНК, вытянутыми от клеток (рис. 3, б, белая стрелка). Такие структуры называют в литературе внеклеточными нейтрофильными ловушками (NET), которые представляют собой один из факторов защиты от патогенов [10]. Известно, что NET выбрасываются активированными нейтрофилами; при этом на тяжах ДНК находятся компоненты гранул нейтрофилов, в том числе и активная МПО. Таким образом, использование СВ позволяет выявить участки синтеза НОСІ на препаратах нейтрофилов, активированных *in situ*.

С помощью проточного цитометра была измерена интенсивность флуоресценции нейтрофилов при различных комбинациях СВ, РМА и ингибитора активности МПО (АВАН) в среде (рис. 4). Сравнение гистограмм флуоресценции нейтрофилов в среде с СВ и без него (рис. 4, а) позволяет предположить проникновение красителя в клетки (увеличение флуоресценции в 7 раз; $p < 0,05$). При стимуляции нейтрофилов 50 нМ РМА происходило значимое ($p < 0,05$) увеличение флуоресценции клеток в 5 раз, по сравнению с неактивированными нейтрофилами (рис. 4, б). Специфический ингибитор активности МПО, АВАН уменьшал интенсивность флуоресценции в 1,5 раза как у нейтрофилов без стимуляции РМА, так и у стимулированных 50 нМ РМА клеток (рис. 4, в, г). Таким образом, окраска нейтрофилов СВ позволяет оценивать интенсивность синтеза НОСІ нейтрофилами и влияние на этот процесс ингибиторов МПО, например, АВАН.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе была показана возможность использования конфокальной микроскопии и про-

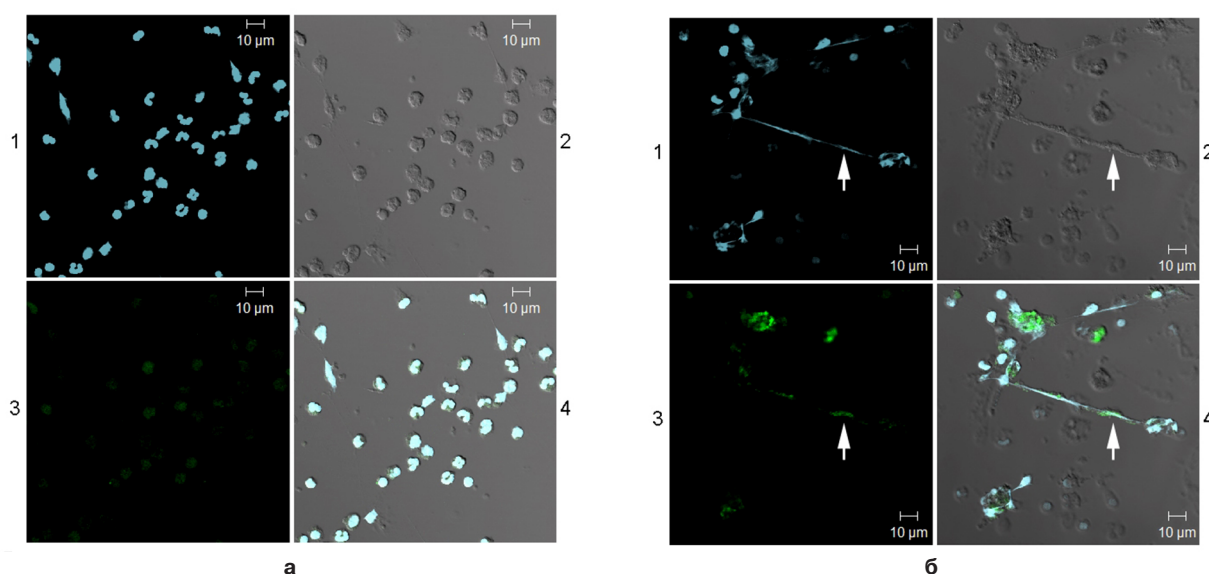


Рис. 3. Изображения препаратов нейтрофилов, полученных с помощью конфокальной микроскопии, при инкубации в присутствии 20 мкМ СВ без РМА (**а**), в присутствии 20 мкМ СВ и 50 нМ РМА (**б**): белой стрелкой обозначена внеклеточная нейтрофильная ловушка (NET); 1 – DAPI (синий); 2 – дифференциально-интерференционный контраст; 3 – флуоресценция, характерная для продукта окисления СВ, при возбуждении лазером с длиной волны 488 нм (зеленый); 4 – совмещенное изображение (1, 2 и 3).

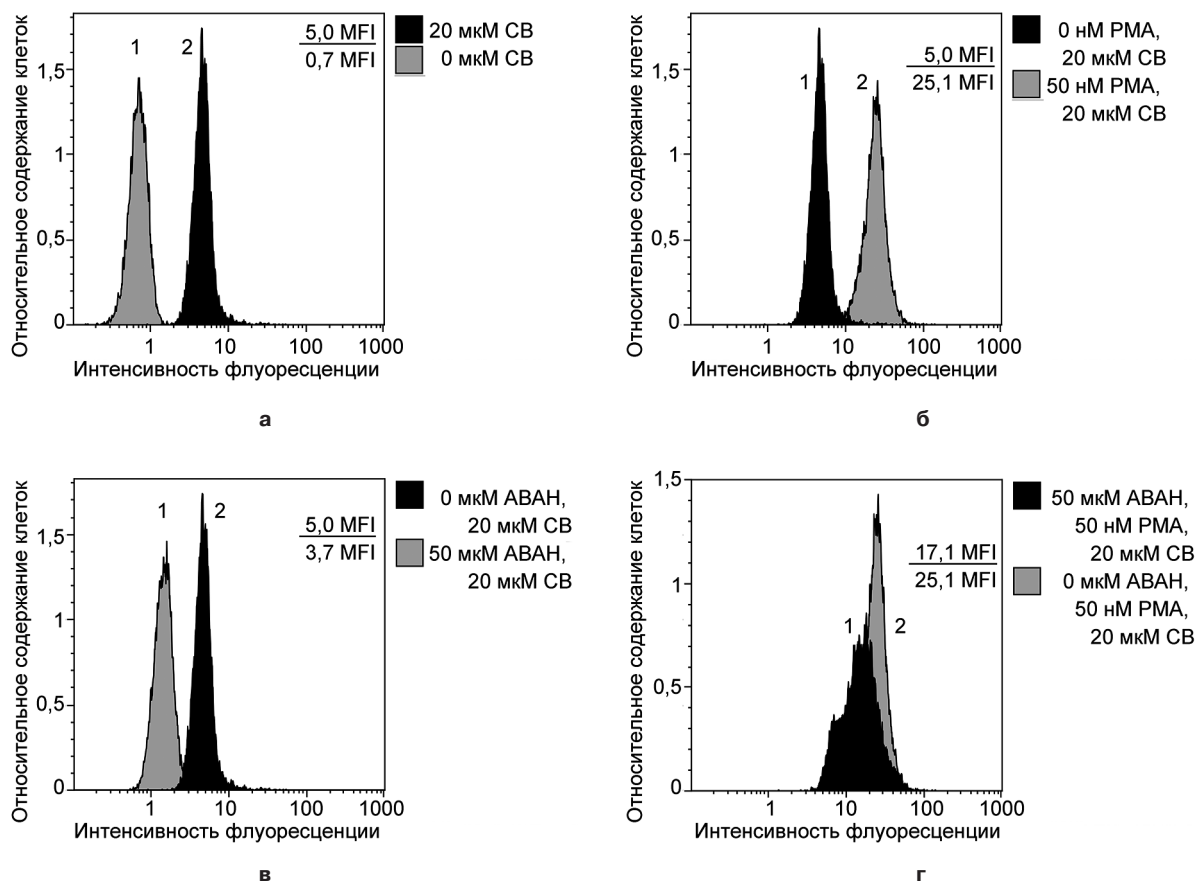


Рис. 4. Гистограммы интенсивности флуоресценции нейтрофилов (регистрация эмиссии – 620 ± 30 нм), полученные с помощью проточной цитометрии: **а** – клетки без СВ (1) и окрашенные 20 мкМ СВ (2); **б** – клетки без ПМА (1) и стимулированные 50 нМ ПМА (2), окрашенные 20 мкМ СВ; **в, г** – окрашенные 20 мкМ СВ клетки без ингибитора МПО (2) и в присутствии 50 мкМ АВАН (1), не стимулированные ПМА (**в**) и стимулированные 50 нМ ПМА (**г**).

точной цитометрии для оценки продукции HOCl нейтрофилами, окрашенными СВ. К преимуществам работы с СВ следует отнести высокую стабильность, специфичность к действию HOCl и N -хлорамину таурина, а также коммерческую доступность этого красителя, по сравнению с уже описанными в литературе флуоресцентными зондами.

Исследование поддержано грантами РФФИ №№ 14-04-00807, 15-04-03620, 16-54-00038.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Панасенко О.М., Горудко И.В., Соколов А.В. Хлорноватистая кислота как предшественник свободных радикалов в живых системах // Успехи биологической химии. – 2013. – Т. 53. – С. 195–244.

Panasenko OM, Gorudko IV, Sokolov AV (2013). Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems [Khlornovatistaya kislota kak predshestvennik svobodnykh radikalov v zhivykh sistemakh]. *Uspekhi biologicheskoy khimii*, (53), 195-244

2. Соколов А.В., Голенкина Е.А., Костевич В.А., Васильев В.Б., Судьина Г.Ф. Взаимодействие церулоплазмينا и 5-липоксигеназы // Биохимия. – 2010. – Т. 75, № 12. – С. 1687–1694.

Sokolov AV, Golenkina EA, Kostevich VA, Vasilyev VB, Sudyina GF (2010). Ceruloplasmin and 5-lipoxygenase

interaction [Vzaimodeystvie tseruloplazmina i 5-lipoksi-genazy]. *Biokhimiya*, 75 (12), 1464-1469.

3. Dypbukt JM, Bishop C, Brooks WM, Thong B, Eriksson H, Kettle AJ (2005) A sensitive and selective assay for chloramine production by myeloperoxidase. *Free Radical Biology and Medicine*, (39), 1468-1477.

4. Flemmig J, Zschaler J, Remmler J, Arnholt J (2012). The fluorescein-derived dye aminophenyl fluorescein is a suitable tool to detect hypobromous acid (HOBr)-producing activity in eosinophils. *Journal of Biological Chemistry*, (287), 27913-27923.

5. Franck T, Minguet G, Delporte C, Derochette S, Zouaoui Boudjeltia K, van Antwerpen P, Gach O, Deby-Dupont G, Mouithys-Mickalad A, Serteyn D (2015). An immunological method to combine the measurement of active and total myeloperoxidase on the same biological fluid, and its application in finding inhibitors which interact directly with the enzyme. *Free Radical Research*, (49), 790-799.

6. Huang J, Milton A, Arnold RD, Huang H, Smith F, Panizzi JR, Panizzi P (2016). Methods for measuring myeloperoxidase activity toward assessing inhibitor efficacy in living systems. *Journal of Leukocyte Biology*, (99), 541-548.

7. Malle E, Furtmüller PG, Sattler W, Obinger C (2007). Myeloperoxidase: a target for new drug development? *British Journal of Pharmacology*, (152), 838-854.

8. Sokolov AV, Kostevich VA, Kozlov SO, Donskiy IS, Vlasova II, Rudenko AO, Zakharova ET, Vasilyev VB, Panasenko OM (2015). Kinetic method for assaying the halogenating activity of myeloperoxidase based on reaction of celestine blue B with taurine halogenamines. *Free Radical Research*, (46), 777-789.

9. Weiss SJ, Klein R, Slivka A, Wei M (1982). Chlorination of taurine by human neutrophils. Evidence for

hypochlorous acid generation. *Journal of Clinical Investigation*, (70), 598-607.

10. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abad U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR, Zychlinsky A (2009). Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*, (5), e1000639.

Сведения об авторах
Information about the authors

Козлов Станислав Олегович – младший научный сотрудник лаборатории клеточных и протеомных технологий отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (197376, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12; тел.: 8 (812) 234-56-06; e-mail: slava7891@yandex.ru)

Kozlov Stanislav Olegovich – Junior Research Officer of the Laboratory of Proteomic and Cell Technologies of the Department of Molecular Genetics of the Institute of Experimental Medicine (197376, Saint-Petersburg, Acad. Pavlov str., 12; tel.: +7 (812) 234-56-06; e-mail: slava7891@yandex.ru)

Кудрявцев Игорь Владимирович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», доцент кафедры иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» (e-mail: igorek1981@yandex.ru)

Kudryavtsev Igor Vladimirovich – Candidate of Biological Sciences, Senior Research Officer of the Department of Immunology of the Institute of Experimental Medicine, Assistant Professor of the Department of Immunology of Pavlov First Saint Petersburg State Medical University (e-mail: igorek1981@yandex.ru)

Грудинина Наталья Андреевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимической генетики отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (e-mail: strangecatnap@gmail.com)

Grudinina Natalya Andreevna – Candidate of Biological Sciences, Senior Research Officer of the Laboratory of Biochemical Genetics of the Department of Molecular Genetics of the Institute of Experimental Medicine (e-mail: strangecatnap@gmail.com)

Костевич Валерия Александровна – аспирант (провизор), научный сотрудник лаборатории клеточных и протеомных технологий отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», научный сотрудник ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России (e-mail: hfa-2005@yandex.ru)

Kostevich Valeriya Aleksandrovna – Postgraduate (Pharmacist), Research Officer of the Laboratory of Proteomic and Cell Technologies of the Department of Molecular Genetics of Institute of Experimental Medicine, Research Officer of FRCC of Physical-Chemical Medicine of FMBA (e-mail: hfa-2005@yandex.ru)

Панасенко Олег Михайлович – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией физико-химических методов исследования и анализа ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России (119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, 1а; тел.: 8 (499) 246-44-90; e-mail: o-panas@mail.ru)

Panasenko Oleg Mikhaylovich – Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Physical and Chemical Methods of Research and Analysis of Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency (119435, Moscow, Malaya Pirogovskaya str., 1a; tel.: +7 (499) 246-44-90; e-mail: o-panas@mail.ru)

Соколов Алексей Викторович – доктор биологических наук, заведующий лабораторией биохимической генетики отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», старший научный сотрудник ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, старший преподаватель Санкт-Петербургского государственного университета (e-mail: biochemsokolov@gmail.com)

Sokolov Aleksey Viktorovich – Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Biochemical Genetics of the Department of Molecular Genetics of Institute of Experimental Medicine, Senior Research Officer of Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Senior Lecturer of Saint-Petersburg State University (e-mail: biochemsokolov@gmail.com)

Васильев Вадим Борисович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», профессор Санкт-Петербургского государственного университета (e-mail: vadim@biokemis.ru)

Vasilyev Vadim Borisovich – Doctor of Medical Sciences, Head of the Department of Molecular Genetics of Institute of Experimental Medicine, Professor of Saint-Petersburg State University (e-mail: vadim@biokemis.ru)