

ISSN 1607-419X

ISSN 2411-8524 (Online)

УДК 612.015.39:616.12-008.331.1-092.9

Влияние солевой нагрузки на уровень обмена белка NAP-22 — мажорного субстрата протеинкиназы С — в гиппокампе и теменной коре крыс со спонтанной гипертензией

Н. З. Ключева¹, Е. Д. Руденко¹, А. С. Альдекеева^{1,2},
А. Ю. Плеханов³, Ю. И. Чернышев¹, О. С. Антонова²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии имени И. П. Павлова» Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт аналитического приборостроения» Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова», Гатчина, Россия

Контактная информация:

Ключева Наталья Зиновьевна,
ФГБУН Институт физиологии
им. И. П. Павлова РАН,
наб. Макарова, д. 6, Санкт-Петербург,
Россия, 199034.
E-mail: natklueva@mail.ru

Статья поступила в редакцию
06.07.16 и принята к печати 16.08.16.

Резюме

Цель исследования — изучить изменения уровня экспрессии матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) NAP-22 и содержание этого белка в цитозоле нейронов гиппокампа и теменной коры крыс со спонтанной гипертензией после действия длительной солевой нагрузки (одного из диетарных факторов патогенеза артериальной гипертензии (АГ)). **Материалы и методы.** В работе использовали самцов крыс линий SHR и WKY до и после потребления 1-процентного раствора NaCl вместо питьевой воды. Уровень мРНК NAP-22 определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени, а содержание белка NAP-22 и его изоформ — методом электрофореза с последующим иммуноблоттингом. **Результаты.** У крыс со спонтанной гипертензией (SHR) в теменной коре повышенное потребление NaCl значительно снижало уровень экспрессии мРНК NAP-22, причем сильнее, чем в гиппокампе; в нормотензивном контроле (WKY) это снижение было еще более выраженным. Содержание белка в теменной коре после солевой нагрузки снижалось в большей степени у крыс линии SHR, чем у их нормотензивного контроля. **Выводы.** Несмотря на то, что повышенное потребление поваренной соли и дефицит кальция в диете вызывают сходные изменения уровня артериального давления, внутриклеточные механизмы формирования АГ в этих двух моделях различны. Внутриклеточные сигнальные каскады, которые задействуются в нейронах различных структур головного мозга в условиях солевой нагрузки, требуют дальнейшего изучения.

Ключевые слова: спонтанная гипертензия, гиппокамп, теменная кора, солевая нагрузка, белок NAP-22; крысы линии SHR

Для цитирования: Ключева Н. З., Руденко Е. Д., Альдекеева А. С., Плеханов А. Ю., Чернышев Ю. И., Антонова О. С. Влияние солевой нагрузки на уровень обмена белка NAP-22 — мажорного субстрата протеинкиназы С — в гиппокампе и теменной коре крыс со спонтанной гипертензией. Артериальная гипертензия. 2017;23(4):325–331. doi:10.18705/1607-419X-2017-23-4-325-331

Metabolism of the major protein kinase C substrate NAP-22 in hippocampus and parietal cortex of spontaneously-hypertensive rats: the impact of dietary salt load

N. Z. Klyueva¹, E. D. Rudenko¹, A. S. Aldekeeva^{1,2},
A. Y. Plekhanov³, Y. I. Chernyshev¹, O. S. Antonova²

¹ Pavlov Institute of Physiology, St Petersburg, Russia

² Institute for Analytical Instrumentation,
St Petersburg, Russia

³ St Petersburg Nuclear Physics Institute,
Gatchina, Russia

Corresponding author:

Natalya Z. Klyueva,
Pavlov Institute of Physiology Russian,
6 Makarova emb., St Petersburg,
199034 Russia.
E-mail: natklyueva@mail.ru

Received 6 July 2016;
accepted 16 August 2016.

Abstract

Objective. To assess the changes in NAP-22 messenger ribonucleic acid (mRNA) expression level as well as NAP-22 protein content in hippocampus and in parietal cortex of spontaneously-hypertensive rats after long-term dietary salt load (nutritional factor of the arterial hypertension, HTN). **Design and methods.** We examined SHR and WKY male rats before and after 1% NaCl consumption instead of drinking water. NAP-22 mRNA level was estimated using real time PCR, and the content of NAP-22 protein and its isoforms was evaluated by electrophoresis with subsequent immunoblotting. **Results.** In spontaneously-hypertensive rats, NAP-22 mRNA expression in parietal cortex significantly decreased after the salt load, the decrease was more profound in parietal cortex than in hippocampus and even more expressed in the normotensive control. After the salt load, NAP-22 protein level in parietal cortex decreased more in SHR rats than in the normotensive rats. **Conclusions.** Although both salt load and dietary calcium deficiency induce similar changes in blood pressure, intracellular mechanisms of developing HTN are different. Intracellular signaling cascades involved in the salt load model need further investigation.

Key words: spontaneous hypertension, hippocampus, parietal cortex, salt load, NAP-22, SHR rats

For citation: Klyueva NZ, Rudenko ED, Aldekeeva AS, Plekhanov AY, Chernyshev YI, Antonova OS. Metabolism of the major protein kinase C substrate NAP-22 in hippocampus and parietal cortex of spontaneously-hypertensive rats: the impact of dietary salt load. Arterial'naya Gipertenziya = Arterial Hypertension. 2017;23(4):325–331. doi:10.18705/1607-419X-2017-23-4-325-331

Введение

Одним из ведущих факторов патогенеза кальций-зависимых форм артериальной гипертензии (АГ) у людей и спонтанной гипертензии у крыс линии SHR являются генетически детерминированные изменения обмена кальция в клетке. Постоянно повышенный уровень кальция в цитоплазме у таких животных неизбежно вызывает изменения в функционировании кальций-зависимых каскадов передачи внутриклеточного сигнала [1–4]. При исследовании особенностей обмена регуляторных белков — мажорных субстратов протеинкиназы С

в различных отделах головного мозга крыс линии SHR это предположение подтвердилось, и мы обнаружили, что содержание NAP-22 и GAP-43 у спонтанно-гипертензивных крыс намного выше, чем в соответствующих структурах их нормотензивного контроля (линии WKY).

Недостаточное поступление кальция в организм неблагоприятно влияет на формирование и протекание АГ [5, 6]. Другим важнейшим фактором диеты, влияющим на устойчивое повышение артериального давления (АД), является избыточное потребление поваренной соли [7, 8]. Те изменения, которые про-

исходят при таком воздействии в почках, изучены достаточно полно [8], однако изменения, происходящие в этих условиях в структурах головного мозга, остаются малоизученными. Особенно это касается метаболизма белков — мажорных субстратов протеинкиназы С. Поэтому в данной работе мы исследовали особенности метаболизма белка NAP-22 при длительном повышенном потреблении поваренной соли в гиппокампе и теменной коре у крыс линии SHR и их нормотензивного контроля (крысы линии WKY).

Реакции организма на потребление NaCl могут варьировать в зависимости от других компонентов диеты, например, низкое потребление калия и кальция увеличивает чувствительность к NaCl, а высокое, наоборот, ослабляет развитие солечувствительной гипертензии [7]. На экспериментальных моделях показан генетический характер такой чувствительности. Также наблюдались, наряду с гипертензией, нарушения в деятельности различных отделов головного мозга. Мы показали, что дефицит кальция в диете затрагивает на таких моделях кальций-зависимые внутриклеточные сигнальные каскады [5], поэтому встает вопрос о внутриклеточных механизмах действия этого фактора, и о том, задействованы ли при этом те же внутриклеточные каскады, что и при дефиците кальция, или же механизмы в обоих случаях различны.

Материалы и методы

В эксперименте использовали по 10 взрослых самцов в качестве контроля (крысы линии WKY и SHR) и по 10 взрослых самцов тех же линий, получавших раствор NaCl в качестве опытной группы. Были использованы крысы-самцы массой $280,7 \pm 9,5$ г, в возрасте 90 дней. Животные содержались в клетке со свободным доступом к еде и воде в условиях 12-часового светового дня. В опытной группе крысы обеих линий получали 1-процентный раствор NaCl в течение 10 дней, а животные, которые служили контролем, получали обычную питьевую воду. При этом корм был сбалансирован в соответствии с нормами и содержал суточную норму потребления кальция, магния и поваренной соли.

Регистрация АД у всех животных производилась манжеточным методом перед началом эксперимента и по его окончании. Животному в индивидуальной камере на хвост надевали окклюзионную манжетку, соединенную с электроманометром «ENEMA» (Швеция). Уровень АД соответствовал величине давления в манжетке в момент прекращения пульсовых колебаний. Рассчитывалось среднее значение системного АД по результатам трех **последовательных** измерений.

По окончании опыта животных декапитировали под легким эфирным наркозом с последующим забором теменной коры и гиппокампа. Все исследования были проведены в соответствии с Международными стандартами по работе с лабораторными животными, и с разрешения комиссии по биоэтике ФГБУН Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН.

Уровень экспрессии матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) NAP-22 определяли в пробах теменной коры крыс обеих групп. Отпрепарированные на льду фрагменты теменной коры и гиппокампа использовались для выделения тотальной мРНК (Quick-RNA™ MiniPrep Kit, Zymo Research). Обратная транскрипция осуществлялась с помощью комплекта реагентов «OT-1» (ЗАО «Синтол», Россия). Все операции по термостатированию и проведению полимеразной цепной реакции в реальном времени проводились в амплификаторе АНК-32 (ИАП РАН). Использовались опубликованные последовательности праймеров к NAP-22 и флуоресцентные зонды (ЗАО «Синтол», Россия). В качестве внутреннего контроля использовали ген β -актина.

Для определения содержания белка NAP-22 и его изоформ белки из образцов гиппокампа или теменной коры (около 30 мг) экстрагировали раствором, содержащим 1% тритон X-100 (1 мл), и эти экстракты фракционировали трихлоруксусной кислотой 1–10% с последующим промыванием спиртом, затем ацетоном. Полученные препараты, обогащенные NAP-22, наносили на старт гелеэлектрофореза с додецилсульфатом натрия. При этом для отдельного выявления агрегированной и дезагрегированной форм NAP-22 пробы растворяли и наносили на форец в 7 М мочеvine (без ДДС-Na) [4]. По завершении электрофореза белки из геля электрофоретически переносили на поливинилидендифторидную мембрану. Избыточную сорбционную емкость мембраны исчерпывали вымачиванием в молоке (в течение 1 часа) и далее осуществляли иммунохимическую процедуру. Для этого мембрану с сорбированными белками выдерживали в растворе поликлональных кроличьих антител, полученных нами против электрофоретически чистого NAP-22 крысы (1:500, 10 часов, +5 °С), промывали физиологическим трис-буферным раствором (3 × 10 минут), далее выдерживали в растворе козьих антител против иммуноглобулина G кролика, меченных пероксидазой хрена (Sigma, 1:500, 1 час, 37 °С), и снова промывали ФБР (3 × 10 минут). Пероксидазную активность на мембране выявляли способом усиленной хемилюминесценции.

Сравнительная оценка содержания белка осуществлялась посредством анализа оцифрованных

данных иммуноблоттинга с помощью программы ScanDens, имеющей распространение в сети, как было описано нами ранее [9]. Этот метод является полуквантитативным и позволяет сравнивать содержание конкретного антигена (в нашем случае – конкретной изоформы NAP-22) только на одной и той же электрофореграмме. При этом содержание белка NAP-22 в пробах оценивалось в процентах (за 100% процентов принимался показатель, соответствующий максимальному значению).

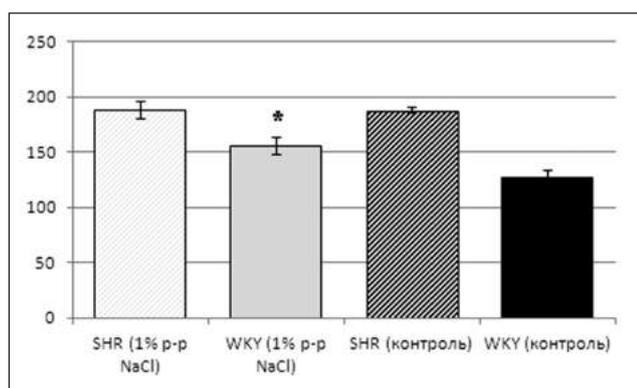
Статистическая обработка

Разницу в экспрессии мРНК NAP-22 и в содержании изоформ NAP-22 оценивали по методу Вилкоксона–Манна–Уитни с использованием стандартного программного обеспечения. Значимыми считали различия, вероятность которых превосходила 95% (в минимальном случае $n = 7$, $U = 0$). Для усреднения параметрических признаков использованы средние и средние отклонения.

Результаты

Полученные результаты представлены на рисунках 1, 2 и 3. На рисунке 1 показаны изменения АД после длительного потребления NaCl у крыс линии SHR (слева) и WKY (справа). У крыс со спонтанной гипертензией отмечался высокий уровень системного АД (до эксперимента 188 ± 3 и 188 ± 8 мм рт. ст. после его окончания), в то время как у крыс WKY исходные данные составляли 127 ± 6 мм рт. ст., а после эксперимента 156 ± 8 мм рт. ст., то есть диета с повышенным содержанием NaCl вызывала

Рисунок 1. Средние значения артериального давления у крыс линии SHR и WKY до и после длительного повышенного потребления NaCl



Примечание: * — статистически значимое различие ($p < 0,01$) уровня артериального давления у крыс линии WKY до и после эксперимента. Значения артериального давления представлены в мм рт. ст. по оси ординат, заштрихованный и черный столбики представляют исходные значения артериального давления, более светлые — после эксперимента. Данные представлены в виде средних значений с ошибками средних ($M \pm m$).

умеренную гипертензию у животных нормотензивной линии.

Уровень экспрессии мРНК NAP-22 в теменной коре и в гиппокампе до и после проводимого эксперимента представлен на рисунке 2. В гиппокампе у крыс линии SHR повышенное потребление NaCl незначительно снижает уровень экспрессии мРНК NAP-22. У крыс линии WKY в гиппокампе, напротив, этот фактор приводит к значимому повышению уровня экспрессии мРНК белка NAP-22, в то время как в контроле экспрессия мРНК этого белка не была выявлена.

В теменной коре диета с повышенным содержанием NaCl снижает уровень экспрессии мРНК NAP-22 как у крыс линии SHR (на $9,7 \pm 2,3\%$, $p < 0,01$), так и у крыс линии WKY (на $19,3 \pm 3,6\%$, $p < 0,01$).

На рисунке 3 представлены данные о содержании агрегированной и дезагрегированной форм белка NAP-22 в гиппокампе и теменной коре у крыс линий SHR и WKY до и после повышенного потребления NaCl, полученные методом электрофореза.

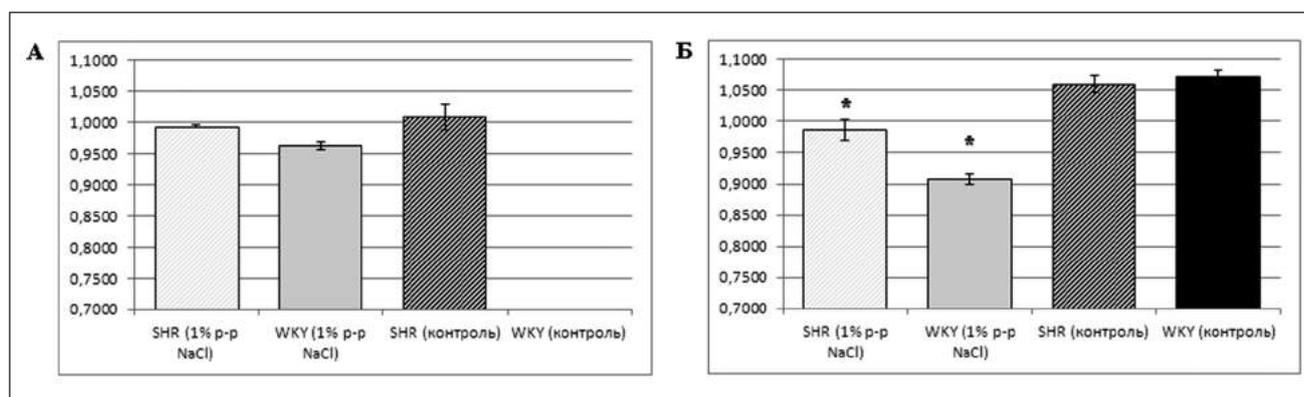
Приведенные иллюстрации оцифрованных данных иммуноблоттинга, полученных методом электрофореза с последующим иммуноблоттингом, являются типичными для всех исследованных животных. По данным денситометрии в гиппокампе за 100 процентов был принят показатель, соответствующий повышенному потреблению NaCl у крыс линии SHR, превышающий контроль лишь незначительно (10%). У крыс линии WKY уже в контроле содержание белка было ниже (45%), повышенное потребление NaCl снижало его до 10%. У крыс линии SHR в гиппокампе повышенное потребление поваренной соли в первую очередь изменяет распределение агрегированной и дезагрегированной форм белка NAP-22 в клетке в пользу агрегированной. Обнаруженное нами незначительное снижение уровня экспрессии мРНК этого белка у крыс линии SHR на его содержание в клетке существенно не влияло. У крыс линии WKY этот фактор снижал содержание не только агрегированной, но и дезагрегированной форм белка в клетке.

В клетках теменной коры за 100 процентов был принят показатель, соответствующий нормальному потреблению NaCl крысами линии SHR. Повышенное потребление соли крысами линии SHR снижало его на 15%, а у крыс линии WKY эффект отсутствовал.

Обсуждение

Межлинейные различия в уровнях экспрессии мРНК NAP-22 в гиппокампе обнаруживались и в условиях нормального потребления NaCl:

Рисунок 2. Уровень экспрессии мРНК NAP-22 (в относительных единицах) в гиппокампе (А) и в теменной коре (Б) крыс линии SHR и WKY до и после повышенного потребления NaCl



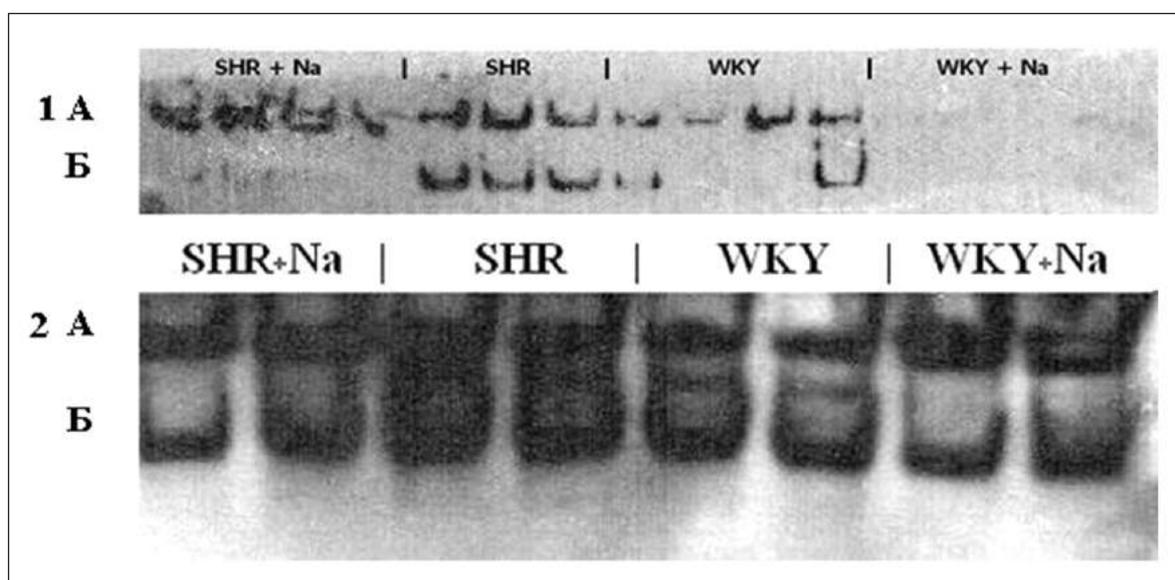
Примечание: * — статистически значимые различия между опытом и контролем ($p < 0,05$). Данные представлены в виде средних и ошибок среднего ($M \pm m$).

у нормотензивных крыс экспрессия отсутствовала, а у гипертензивных крыс мРНК NAP-22, напротив, была обнаружена. Потребление поваренной соли также воздействовало на уровень экспрессии мРНК NAP-22 различным образом у крыс разных линий: у крыс со спонтанной гипертензией мы обнаружили только тенденцию к снижению уровня мРНК этого белка, а не статистически значимые изменения, а у крыс линии WKY, напротив, выявился существенный рост этого показателя ($p < 0,01$). При исследовании содержания белка в цитозоле методом электрофореза мы рассматривали две его формы (агрегированную и неагрегированную). Оказалось, что, как и в случае экспрессии его мРНК, здесь имеются межлинейные различия. До начала действия солевой нагрузки у крыс ли-

нии WKY содержание белка NAP-22 в цитозоле было ниже, чем у крыс линии SHR, и это касалось обеих форм белка. Солевая нагрузка вызывала резкое снижение (вплоть до исчезновения у крыс линии WKY) содержания этого белка в цитозоле (у крыс линии SHR исчезла неагрегированная форма белка).

В теменной коре у крыс обеих линий наблюдалась схожая картина — повышенное потребление NaCl вызывало снижение уровня экспрессии (более выраженное у крыс линии WKY, $p < 0,01$) и значимое ($p < 0,05$), но менее выраженное у крыс линии SHR. Содержание белка NAP-22 в клетке при действии солевой нагрузки изменялось мало, и это касалось как агрегированной, так и неагрегированной форм белка.

Рисунок 3. 1. Содержание агрегированной (А) и дезагрегированной (Б) форм NAP-22 в гиппокампах крыс линий WKY и SHR. 2. Содержание агрегированной (А) и дезагрегированной (Б) форм NAP-22 в теменной коре крыс линий WKY и SHR



Примечание: Представлены данные электрофореза с последующим иммуноблоттингом.

Таким образом, полученные данные существенно отличаются от тех, которые мы получили при исследовании влияния дефицита кальция в диете на уровень обмена белка NAP-22 при АГ [4, 8]. Тогда мы отмечали, наоборот, возрастание содержания белка NAP-22 в клетке и экспрессии его мРНК в условиях развития гипертензии.

Самым удивительным при воздействии повышенного потребления NaCl на обмен белка NAP-22 в структурах головного мозга крыс являются разнонаправленные изменения уровня экспрессии его мРНК, с одной стороны, и содержания его в цитозоле, с другой стороны. Это может означать нарушение баланса между процессами экспрессии генов этого белка, процессами его трансляции и последующей деградации самого белка. В соответствии с литературными данными [10] от 15 до 70 процентов изменений уровня белка может быть объяснено посттранскрипционной и посттрансляционной регуляцией, то есть эти процессы и процессы деградации белка могут играть даже доминирующую роль в регуляции уровня экспрессии. Случаи, при которых наблюдается отсутствие корреляции между уровнем экспрессии и содержанием уже синтезированного белка, отмечаются и другими авторами [11].

Выводы

Таким образом, мы можем сделать следующие выводы:

1. Два диетарных фактора (дефицит кальция в диете и солевая нагрузка), играющие важнейшую роль в патогенезе АГ, вызывая сходные изменения уровня АД, реализуются через разные внутриклеточные механизмы.

2. Внутриклеточные сигнальные каскады, задействованные в нейронах различных структур головного мозга в условиях солевой нагрузки, требуют дальнейшего изучения.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

- Wayman GA, Tokumitsu H, Davare MA, Soderling TR. Analysis of CaM-kinase signaling in cells. *Cell calcium*. 2011;50(1):1–8.
- Nieves-Cintrón M, Amberg GC, Navedo MF, Molkentin JD, Santana LF. The control of Ca²⁺ influx and NFATc3 signaling in arterial smooth muscle during hypertension. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(40):15623–15628.
- Zicha J, Kuneš J. Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat. *Physiol Rev*. 1999;79(4):1227–1282.

- Plekhanov A. Ю., Антонова О. С., Петрова Е. И., Резник С. Я., Ключева Н. З. Изменения обмена регуляторного белка мозга NAP-22 у крыс со спонтанной гипертензией и крыс линии WKY на ранних этапах постнатального онтогенеза, рожденных и выращенных самками при дефиците экзогенного кальция. Доклады академии наук. 2013;452(2):233–237. [Plekhanov AY, Antonova OS, Petrova EI, Reznik SY, Klyueva NZ. The changes in metabolism of the regulatory brain protein NAP-22 at the early stages of postnatal ontogeny in spontaneous hypertensive and WKY rats born to females fed with calcium-deficient diet. *Doklady Akademii Nauk = The Reports of the Academy of Sciences, Biological Sciences*. 2013;452(1):261–265. In Russian].

- Чурина С. К., Ключева Н. З., Антонова О. С., Руденко Е. Д., Петрова Е. И., Макаров В. Л. и др. Генетически детерминированные механизмы развития артериальной гипертензии при дефиците экзогенного кальция (паратиреоидный гипертензивный фактор). *Артериальная гипертензия*. 2015;20(5):342–348. doi:10.18705/1607-419X-2014-20-5-342-348 [Tchurina SK, Klueva NZ, Antonova OS, Rudenko ED, Petrova EI, Makarov VL et al. Genetically determined mechanisms of arterial hypertension related to dietary calcium deficiency (parathyroid hypertensive factor). *Arterial'naya Gipertenziya = Arterial Hypertension*. 2014;20(5):342–348. doi:10.18705/1607-419X-2014-20-5-342-348. In Russian].

- McCarron DA. Calcium in the pathogenesis and therapy of human hypertension. *Am J Med*. 1985;78(suppl. 2B):27–34.

- Kotchen TA, Cowley AW, Frohlich ED. Salt in health and disease — a delicate balance. *N Engl J Med*. 2013;368(13):1229–1237.

- Meneton P, Jeunemaitre X, de Wardener HE, MacGregor GA. Links between dietary salt intake, renal salt handling, blood pressure, and cardiovascular diseases. *Physiol Rev*. 2005;85(2):679–715.

- Антонова О. С., Плеханов А. Ю., Петрова Е. И., Резник С. Я., Ключева Н. З. Структурные изменения белка NAP-22 — основного субстрата протеинкиназы С при кальций-зависимых формах артериальной гипертензии. *Артериальная гипертензия*. 2011;17(4):38–46. [Antonova OS, Plekhanov AY, Petrova EI, Reznik SY, Klueva NZ. Structural modifications of NAP-22 in the brain of spontaneously hypertensive rats. *Arterial'naya Gipertenziya = Arterial Hypertension*. 2011;17(4):38–46. In Russian].

- de Sousa Abreu R, Penalva LO, Marcotte EM, Vogel C. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Molecular BioSystems*. 2009;5(12):1512–1526.

- Kendrick N. A gene's mRNA level does not usually predict its protein level. Kendrick Laboratories, Inc., Madison, WI. 2014.

Информация об авторах:

Ключева Наталия Зиновьевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной и клинической кардиологии ФГБУН Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН;

Руденко Егор Дмитриевич — младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной и клинической кардиологии ФГБУН Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН;

Альдекеева Анна Сергеевна — младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной и клинической кардиологии ФГБУН Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, инженер лаборатории методов и приборов иммунного и генетического анализа ФГБУН Институт аналитического приборостроения РАН;

Плеханов Антон Юрьевич — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биополимеров ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова;

Чернышев Юрий Игоревич — младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной и клинической кардиологии ФГБУН Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН;

Антонова Ольга Сергеевна — кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории методов и приборов иммунного и генетического анализа ФГБУН Институт аналитического приборостроения РАН.

Author information

Natalya Z. Klyueva, PhD, Senior Researcher, Cardiology Laboratory, Pavlov Institute of Physiology;

Egor D. Rudenko, Junior Researcher, Cardiology Laboratory, Pavlov Institute of Physiology;

Anna S. Aldekeeva, Junior Researcher, Cardiology Laboratory, Pavlov Institute of Physiology, Engineer, Laboratory of Methods and Instruments for Genetic and Immunoassay Analysis, Institute for Analytical Instrumentation;

Anton Y. Plekhanov, PhD, Researcher, Laboratory of Biopolymers, Petersburg Nuclear Physics Institute;

Yuri I. Chernyshev, Junior Researcher, Cardiology Laboratory, Pavlov Institute of Physiology;

Olga S. Antonova, PhD, Researcher, Laboratory of Methods and Instruments for Genetic and Immunoassay Analysis, Institute for Analytical Instrumentation.