

DOI: <https://doi.org/10.22263/2312-4156.2022.4.29>

Оценка взаимодействия ФНО-альфа с олигопептидом Trp-Asn-Trp-Val in vitro

Т.В. Рябцева, А.Д. Таганович, Д.А. Макаревич

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2022. – Том 21, №4. – С. 29-34.

The assessment of TNF- α interaction with oligopeptide Trp-Asn-Trp-Val in vitro

T.V. Ryabtseva, A.D. Tahanovich, D.A. Makarevich

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2022;21(4):29-34.

Резюме.

Актуальность разработки низкомолекулярных соединений, способных блокировать ФНО- α , связана в первую очередь с тем, что гиперпродукция данного цитокина в организме человека является патогенетическим фактором в развитии многих заболеваний, а широкое клиническое применение антицитокиновых препаратов на основе антител имеет ряд ограничений.

Цель работы – экспериментальное изучение взаимодействия ФНО- α с синтетическим олигопептидом Trp-Asn-Trp-Val, который является структурным аналогом растворимого рецептора к ФНО- α .

Материал и методы. Взаимодействие цитокина оценивали по изменению концентрации ФНО- α после связывания его со свободной и иммобилизованной формой олигопептида. Иммобилизацию олигопептида проводили путем адсорбции на дне лунки 96-луночного планшета и включением пептида в состав трехмерной сетки полиакриламидного геля. Концентрацию ФНО- α определяли методом иммуноферментного анализа.

Результаты исследования показали, что зависимость количества связанного с олигопептидом цитокина от его исходной концентрации носит гиперболический характер. Свободная форма олигопептида связывает 6,8 (5,5;8,1) пМ/мл, адсорбированная на планшете – 5,1 (4,3;5,8) пМ/мл ФНО- α . Иммобилизация олигопептида в геле существенно увеличивает способность олигопептида Trp-Asn-Trp-Val связывать ФНО- α . Максимальная концентрация ФНО- α плазмы крови, связанного иммобилизованным в гель пептидом, составила 16,8 (14,3;19,2) пМ/мл.

Заключение. Таким образом, исследования показали, что олигопептид Trp-Asn-Trp-Val как в свободной, так и в иммобилизованной форме обладает выраженной способностью связывать ФНО- α и может быть использован в качестве лиганда для гемосорбентов.

Ключевые слова: фактор некроза опухоли-альфа, олигопептид, цитокины, системный воспалительный ответ.

Abstract.

The hyperproduction of TNF- α in the human body is a pathogenetic factor of many diseases development. The widespread clinical use of anticytokine drugs based on antibodies has a number of limitations. Therefore, the development of low molecular weight compounds for this cytokine blocking is a priority.

Objectives. To experimentally study the interaction of TNF- α with the synthetic oligopeptide Trp-Asn-Trp-Val, which is a structural analog of the soluble TNF- α receptor.

Material and methods. For registration of the interaction of the cytokine with oligopeptide the change in the concentration of TNF- α after its binding to the free and immobilized form of the oligopeptide was assessed. The immobilization of the oligopeptide was carried out by adsorption on the bottom of the well of a 96-well plate and incorporation of the peptide into a three-dimensional network of polyacrylamide gel. The concentration of TNF- α was determined by enzyme immunoassay. The results of the study have shown that the dependence of the bound cytokine amount on its initial concentration is hyperbolic. The free form of the oligopeptide binds 6.8 (5.5; 8.1) pM/ml, adsorbed on the plate – 5.1 (4.3; 5.8) pM/ml of

TNF- α . Immobilization of the oligopeptide in the gel significantly increases the ability of Trp-Asn-Trp-Val oligopeptide to bind TNF- α . The maximum concentration of TNF- α in blood plasma bound by the immobilized in gel peptide made up 16.8 (14.3; 19.2) pM/ml.

Thus, the conducted studies have shown that the oligopeptide Trp-Asn-Trp-Val, both in free and immobilized form, possesses a pronounced ability to bind TNF- α and may be used as a ligand for hemosorbents.

Keywords: tumor necrosis factor-alpha, oligopeptide, cytokines, systemic inflammatory response.

Введение

Фактор некроза опухолей альфа (ФНО- α) представляет собой полипептид (17 кДа), который является продуктом активации моноцитов/макрофагов, эндотелиальных, тучных и миелоидных клеток, лимфокинактивированных клеток, клеток нейроглии. ФНО- α является одним из основных провоспалительных цитокинов, системное действие которых заключается в том, что они являются эндогенными пирогенами, индуцируют продукцию лейкоцитов в красном костном мозге и поступление их в циркуляторное русло, стимулируют продукцию факторов роста. Влияние на метаболизм заключается в развитии гипергликемии, резорбции костной ткани и кахексии [1-3]. При гиперпродукции ФНО- α происходит генерализация воспалительной реакции, исходом которой является полиорганное повреждение [4, 5].

Разработка терапевтических подходов для снижения концентрации цитокинов в организме является актуальной задачей. В первую очередь это связано с наличием побочного действия и развитием осложнений при применении лекарственных средств с антицитокиновой активностью. Во-вторых, широкое внедрение лекарственных средств на основе рекомбинантных белков и моноклональных антител ограничивается их высокой стоимостью [6-8]. Перспективным направлением исследования является разработка олигопептидов, способных блокировать (связывать) биологически активные молекулы, для снижения их концентрации в плазме крови пациентов с выраженной воспалительной реакцией. Синтез олигопептидов не требует значительных финансовых затрат, а применение у человека безопасно. За счет низкой молекулярной массы они не обладают иммуногенностью (в отличие от моноклональных антител) [9-11].

Методами молекулярного моделирования было установлено, что тетрапептид Trp-Asn-Trp-Val, являющийся структурным аналогом цитокинсвязывающей области ФНО- α -R2, имеет

максимальное по модулю значение свободной энергии связывания как с мономерной, так и с тримерной формой ФНО- α [11]. Поэтому целью данного исследования являлась экспериментальная оценка взаимодействия олигопептида Trp-Asn-Trp-Val с ФНО- α .

Материал и методы

Для экспериментов использовали: Trp-Asn-Trp-Val (WNWV) производства Changzhou Xuanming Chemical Co. Ltd. (Чанчжоу, Цзянсу, Китай); рекомбинантный ФНО- α (Fine test, Китай); карбонатный буфер (15мМ Na₂CO₃, 35мМ NaHCO₃, 0,2 г/л NaN₃, pH9,3). Раствор пептида (10 М/мл) в карбонатном буфере. Концентрат фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ-10X). Раствор для промывки – ФСБ-1X содержащий 0,05% Tween20 (ФСБ-Т). Раствор для блокировки – ФСБ-Т с 10 мг/мл бычьим сывороточным альбумином (ФСБ-Т-БСА). Раствор ФНО- α в концентрациях: 0; 5,0; 15,0; 40,0; 100,0; 250,0 пг/мл. Набор реагентов для иммуоферментного определения ФНО- α (Вектор-Бест, Россия). Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре (Thermo Scientific, США) при длине волны 450 нм.

В первой серии экспериментов 100 мкл (10 μ М/мл) раствора олигопептида и 100 мкл раствора рекомбинантного цитокина (в концентрациях 0; 5,0; 15,0; 40,0; 100,0; 250,0 пг/мл) смешивали и инкубировали около 2 часов при комнатной температуре. Использованные концентрации позволили создать значительный избыток количества олигопептида (количество олигопептида в лунке составило 1 μ М или 520*10⁶ пг) по сравнению с количеством ФНО- α (250,0 пг/мл это 0,25 пг или 1,47*10⁻¹¹ μ М). После инкубации определяли концентрацию цитокина методом иммуоферментного анализа. На основании изменения концентрации по сравнению с контрольным раствором (без олигопептида) делали вывод о взаимодействии олигопептида с цитокином.

Во второй серии экспериментов пептид (1 μM /в лунке) фиксировали путем адсорбции на дне лунок 96-луночного планшета. После этого вносили раствор рекомбинантного ФНО- α и с помощью коммерческого набора реактивов методом иммуноферментного анализа оценивали концентрацию цитокина. Контролем служила концентрация цитокина в лунках с адсорбированными специфическими моноклональными антителами и лунки, на дне которых не были адсорбированы ни пептиды, ни моноклональные антитела.

Для третьей серии экспериментов олигопептид иммобилизовали путем введения на стадии полимеризации в полиакриламидный гель (концентрация пептида составила 1 μM /на мл геля). Круглодонные пробирки заполняли полиакриламидным гелем с иммобилизованным пептидом (5 мл), вносили 5 мл плазмы крови, в которой концентрация ФНО- α составляла 871,8 (815,8;957,2) пг/мл. Инкубировали 60 мин при комнатной температуре. Затем собирали плазму для определения концентрации ФНО- α .

Серия экспериментов состояла из 8 повторов, при проведении эксперимента каждая проба дублировалась, статистический анализ проводили для $n=16$ в каждой точке. Описание полученных результатов и анализ статистической значимости полученных различий проводили непараметрическими методами статистического анализа с использованием

пакетов статистического анализа данных Statistical10.0 («StatSoft Inc.») и Prism8 Statistics («GraphPad Software»). Для представления результатов рассчитывали медиану и интерквартильный размах (25%-75%). Анализ результатов экспериментальных исследований осуществляли методом нелинейной регрессии, с помощью которого моделируется функция зависимости одной переменной от другой. Для оценки соответствия модели полученным результатам анализировали величину коэффициента детерминации (R^2).

Результаты и обсуждение

Согласно полученным результатам, при иммуноферментном определении ФНО- α , оптическая плотность опытной смеси (ФНО- α +WNWV) ниже, чем контрольной (ФНО- α +буфер) (рис. 1А). Снижение оптической плотности свидетельствует о снижении количества ФНО- α , способного к взаимодействию с детектирующими антителами из-за связывания с олигопептидами.

Концентрацию цитокина в лунках определяли по калибровочному графику, построенному по медианным значениям величины оптической плотности в контрольных лунках. Концентрацию комплекса цитокина с пептидом [ФНО- α +WNWV] рассчитывали по разнице кон-

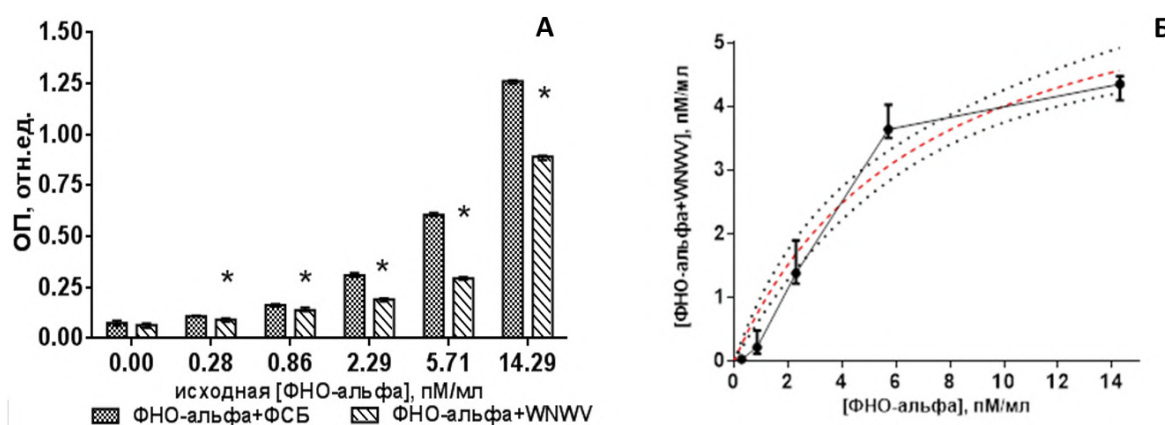


Рисунок 1 – Результаты определения концентрации ФНО- α , связанного со свободной формой олигопептида Trp-Asn-Trp-Val: А – Изменение величины оптической плотности раствора в лунках после добавления ФНО- α , ФНО- α +ФСБ – контрольная смесь ($n=16$), ФНО- α +WNWV – опытная смесь ($n=16$); объем смеси 200 мкл; концентрация пептида в опытных пробах – 1 μM ; ФСБ – фосфатно-солевой буфер, pH=7,4; WNWV – пептид Trp-Asn-Trp-Val; ОП – оптическая плотность; * – статистически значимая разница между группами с $p \leq 0,05$ (тест Манна-Уитни); Б – Линейная интерполяция зависимости концентрации ФНО- α , связанного с Trp-Asn-Trp-Val от исходной концентрации цитокина; пунктирной линией обозначен график нелинейной интерполяции, с $R^2=0,85$

центрации ФНО- α в контрольном и опытном растворах. Максимальная концентрация комплекса составила 4,50 (4,46;4,60) пМ/мл в смеси, в которой использовали раствор ФНО- α в концентрации 14,29 пМ/мл или 250,0 пг/мл. При нарастании исходной концентрации цитокина в условиях избытка олигопептида происходит увеличение цитокина, связавшегося с WNWV.

Зависимость концентрации комплекса [ФНО- α +WNWV] от исходной концентрации ФНО- α описывается гиперболой (рис. 1Б). Согласно анализу графика зависимости была рассчитана максимальная концентрация комплекса [ФНО- α +WNWV] – 6,79 (5,50;8,07) пМ/мл и равновесная концентрация ФНО- α равная 6,93 (4,08;9,78) пМ/мл, при которой достигается $\frac{1}{2}$ от максимального связывания.

Анализ результатов степени связывания олигопептида с цитокином показал, что при использовании ФНО- α в концентрации 40 пг/мл и 100 пг/мл наблюдаются высокие значения степени связывания – 56,1 (51,9;59,7)% и 61,4 (60,7;62,0)% соответственно. При концентрации ФНО- α 15 пг/мл и 250 пг/мл степень связывания составила 32,6 (17,1;46,5)% и 31,8 (31,5;32,8)% соответственно. Проанализировав данную зависимость методом нелинейной регрессии, установили, что взаимодействие ФНО- α с олигопептидом может быть описано моделью неспецифического связывания (рис. 2А). Коэффициент детерминации (R^2) данной модели составил 0,6081, что свидетельствует о высокой степени соответствия данной модели полученным результатам эксперимента. В то же время, соответствие модели специфического связывания (рис. 2Б) цитокина с олигопептидом было низким ($R^2 \leq 0,5$).

Эксперименты с олигопептидом, адсорбированным на дне лунки планшета, показали, что в лунках, на дне которых отсутствовал пептид, оптическая плотность, после инкубации в них ФНО- α , находилась на уровне фоновых значений, что свидетельствует об отсутствии молекул ФНО- α , которые, не будучи связанными с пластиком через адсорбированный пептид или моноклональными антителами, удалились во время этапа промывки при постановке цветной реакции.

В лунках, на дне которых был адсорбирован олигопептид, величина оптической плотности увеличивалась пропорционально концентрации добавленного раствора цитокина, что свидетельствовало о связывании ФНО- α с пептидом на дне лунки. В лунках, на дне которых был адсорбирован пептид, регистрировали более высокие значения оптической плотности по сравнению с лунками, на которых адсорбировали олигопептид. Это свидетельствует о том, что моноклональные антитела связывают больше молекул цитокина, чем олигопептид. При увеличении концентрации ФНО- α , вносимого в лунку, увеличивается количество цитокина, связанного с пептидом. Однако при концентрации 5,71 пМ/мл и 14,29 пМ/мл статистически значимой разницы в концентрации связанного цитокина не обнаруживается (табл. 1).

Анализ зависимости концентрации комплекса ФНО- α с пептидом от исходной концентрации цитокина описывается гиперболой. Анализ данного графика показал, что максимально возможная концентрация комплекса составляет 5,11 (4,35;5,85) пМ/мл, а равновесная концентрация ФНО- α – 4,72 (3,03;6,41) пМ/мл. Гиперболический характер зависимости свидетельствует о насыщении олигопептидов, доступных для взаи-

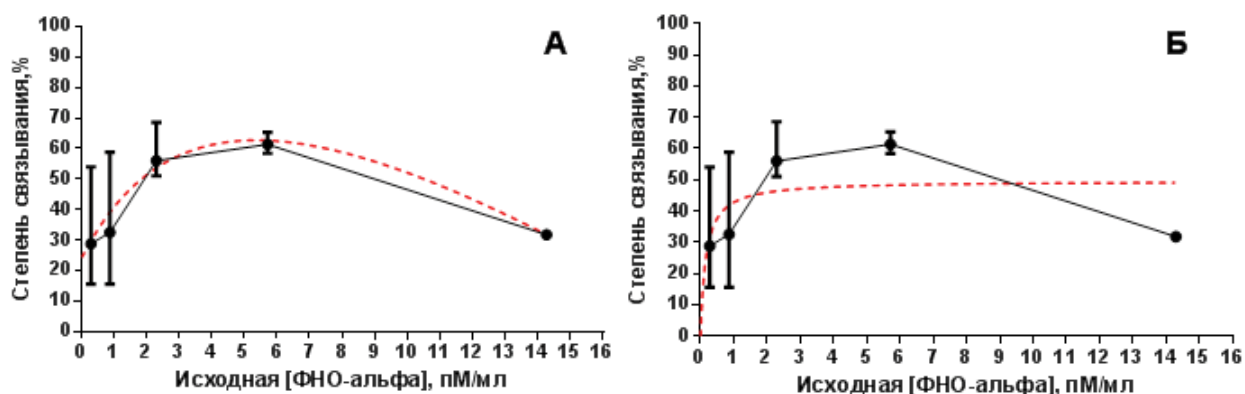


Рисунок 2 – Результаты анализа зависимости степени связывания ФНО- α с олигопептидом Trp-Asn-Trp-Val

Таблица 1 – Результаты оценки связывания ФНО-α

[ФНО-α], пМ/мл	[WNWV+ФНО-α], пМ/мл	Степень связывания, %
0,29	0,22 (0,19;0,24)	87,6 (81,3;96,0)
0,86	0,66 (0,61;0,68)*	74,9 (74,5;78,1)*
2,29	1,60 (1,57;1,67)*	64,5 (64,0;65,0)*
5,71	2,96 (2,86;3,02)*	50,2 (48,3;51,0)*
14,29	4,00 (3,23;4,38)	30,1 (22,9;33,1)*

Примечание: [ФНО-α] – концентрация ФНО-α, вносимого в лунку, [WNWV+ФНО-α] – концентрация ФНО-α, связанного с адсорбированным в лунке Trp-Asn-Trp-Val; * – $p \leq 0,05$ при попарном сравнении с предыдущим значением в списке (тест Манна-Уитни).

модействия с молекулами цитокина, т.к. при адсорбции олигопептида на дне лунки существует вероятность стерических препятствий, вследствие большой разницы в пространственной структуре лиганда (олигопептида) и молекулы-мишени (цитокина) [12].

Результаты исследования связывающей активности олигопептида, иммобилизованного в полиакриламидный гель, показали, что концентрация ФНО-α, сорбированного гелем с пептидом, увеличивается пропорционально росту исходной концентрации цитокина в плазме крови. Рост исходной концентрации цитокина в плазме крови с 6,27 (5,84;6,91) пМ/мл до 49,82 (46,62;54,7) пМ/мл сопровождался увеличением количества ФНО-α, сорбированного гелем с пептидом с 4,55 (4,31;5,15) пМ/мл до 13,22 (10,94;15,44) пМ/мл. Гель без пептида удалял 0,41 (0,24;0,61) пМ/мл и 2,01 (1,42;2,82) пМ/мл ФНО-α соответственно. Гель с иммобилизованным WNWV сорбирует в 8-10 раз больше ФНО-α, чем гель без пептида. Таким образом, включение в трехмерную сетку ПААГ олигопептида способствует удалению молекул цитокина из плазмы крови посредством его взаимодействия с олигопептидом.

Зависимость количества ФНО-α, связанного с пептидом, включенным в трехмерную сетку полиакриламидного геля, от исходной концентрации цитокина также описывается гиперболой. Максимальная концентрация ФНО-α, связанного гелем с пептидом, составила 16,8 (14,3;19,2) пМ/мл.

Заключение

Полученные результаты экспериментов свидетельствуют о том, что олигопептид Trp-Asn-Trp-Val как в свободной форме, так и в иммобилизованной на дне лунки планшета обладает выраженной способностью связывать ФНО-α.

Зависимость количества цитокина, связанного с пептидом, от исходной концентрации ФНО-α носит гиперболический характер. Максимальное количество ФНО-α, связанного со свободной формой олигопептида, составляет 6,79 (5,50;8,07) пМ/мл, с олигопептидом, адсорбированным на планшете – 5,11 (4,35;5,85) пМ/мл. Иммобилизация олигопептида в гель существенно увеличивает способность пептида связываться с цитокином. Максимальная концентрация ФНО-α плазмы крови, связанного иммобилизованным в гель пептидом, составила 16,8 (14,3;19,2) пМ/мл.

Литература

1. Aggarwal, B. B. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey / B. B. Aggarwal, S. C. Gupta, J. H. Kim // *Blood*. 2012 Jan. Vol. 119, N 3. P. 651–665. doi: 10.1182/blood-2011-04-325225
2. Kalliolias, G. D. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies / G. D. Kalliolias, L. B. Ivashkiv // *Nat. Rev. Rheumatol.* 2016 Jan. Vol. 12, N 1. P. 49–62. doi: 10.1038/nrrheum.2015.169
3. Bazzoni, F. The tumor necrosis factor ligand and receptor families / F. Bazzoni, B. Beutler // *N. Eng. J. Med.* 1996 Jun. Vol. 334, N 26. P. 1717–1725. doi: 10.1056/NEJM199606273342607
4. Современная концепция патогенеза сепсиса и перспективные подходы к его терапии (лекция) / А. Б. Зилькарнаев [и др.] // *Альм. клин. медицины*. 2014. № 30. С. 91–98
5. Anti-TNF-a therapies: the next generation / M. A. Palladino [et al.] // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003 Sep. Vol. 2, N 9. P. 736–746. doi: 10.1038/nrd1175
6. Tayal, V. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics – an update / V. Tayal, B. S. Kalra // *Eur. J. Pharmacol.* 2008 Jan. Vol. 579, N 1/3. P. 1–12. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.10.049
7. Desai, S. B. Problems encountered during anti-tumor necrosis factor therapy / S. B. Desai, D. E. Furst // *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 2006 Aug. Vol. 20, N 4. P. 757–790. doi: 10.1016/j.berh.2006.06.002
8. Lau, J. L. Therapeutic peptides: historical perspectives, current development trends, and future directions / J. L. Lau, M. K. Dunn // *Bioorganic Med. Chem.* 2017 Jul. Vol. 26, N 10. P. 2700–2707. doi: 10.1016/j.bmc.2017.06.052

9. Mascini, M. Nucleic Acid and Peptide Aptamers: Fundamentals and Bioanalytical Aspects / M. Mascini, I. Palchetti, S. Tombelli // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2012 Feb. Vol. 51, N 6. P. 1316–1332. doi: 10.1002/anie.201006630
10. Menegatti, S. The hidden potential of small synthetic molecules and peptides as affinity ligands for bioseparations / S. Menegatti, A. D. Naik, R. G. Carbonell // *Pharm. Bioprocess.* 2013. Vol. 1, N 5. P. 467–485.
11. Рябцева, Т. В. Моделирование и анализ взаимодействия олигопептидов с фактором некроза опухолей-альфа / Т. В. Рябцева, Д. А. Макаревич, А. Д. Таганович // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук.* 2021. Т. 66, № 4. С. 453–461. doi: 10.29235/1029-8940-2021-66-4-453-461
12. Competition between bound and free peptides in an ELISA-based procedure that assays peptides derived from protein digests / O. Braitbard [et al.] // *Proteome Sci.* 2006 May. Vol. 4. P. 12. doi: 10.1186/1477-5956-4-12

Поступила 16.05.2022 г.

Принята в печать 10.08.2022 г.

References

1. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood.* 2012 Jan;119(3):651-65. doi: 10.1182/blood-2011-04-325225
2. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol.* 2016 Jan;12(1):49-62. doi: 10.1038/nrrheum.2015.169
3. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med.* 1996 Jun;334(26):1717-25. doi: 10.1056/NEJM199606273342607
4. Zulkarnaev AB, Vatazin AV, Pasov SA, Podoinitsyn AA. Modern concept of sepsis pathogenesis and promising approaches to its therapy (lecture). *Al'm Klin Meditsiny.* 2014;(30):91-8. (In Russ.)
5. Palladino MA, Bahjat FR, Theodorakis EA, Moldawer LL. Anti-TNF- α therapies: the next generation. *Nat Rev Drug Discov.* 2003 Sep;2(9):736-46. doi: 10.1038/nrd1175
6. Tayal V, Kalra BS. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics – an update. *Eur J Pharmacol.* 2008 Jan;579(1-3):1-12. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.10.049
7. Desai SB, Furst DE. Problems encountered during anti-tumor necrosis factor therapy. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2006 Aug;20(4):757-90. doi: 10.1016/j.berh.2006.06.002
8. Lau JL, Dunn MK. Therapeutic peptides: historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic Med Chem.* 2017 Jul;26(10):2700-7. doi: 10.1016/j.bmc.2017.06.052
9. Mascini M, Palchetti I, Tombelli S. Nucleic Acid and Peptide Aptamers: Fundamentals and Bioanalytical Aspects. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2012 Feb;51(6):1316-32. doi: 10.1002/anie.201006630
10. Menegatti S, Naik AD, Carbonell RG. The hidden potential of small synthetic molecules and peptides as affinity ligands for bioseparations. *Pharm Bioprocess.* 2013;1(5):467-85.
11. Riabtceva TV, Makarevich DA, Taganovich AD. Modeling and analysis of oligopeptide interaction with tumor necrosis factor- α . *Vest Nats Akad Navuk Belarusi Ser Biyal Navuk.* 2021;66(4):453-461. (In Russ.) doi: 10.29235/1029-8940-2021-66-4-453-461
12. Braitbard O, Glickstein H, Bishara-Shieban J, Pace U, Stein WD. Competition between bound and free peptides in an ELISA-based procedure that assays peptides derived from protein digests. *Proteome Sci.* 2006 May;4:12. doi: 10.1186/1477-5956-4-12.

Submitted 16.05.2022

Accepted 10.08.2022

Сведения об авторах:

Т.В. Рябцева – научный сотрудник научно-исследовательской части, аспирант кафедры биологической химии, Белорусский государственный медицинский университет

E-mail: ta-yana@yandex.ru – Рябцева Татьяна Владимировна;

А.Д. Таганович – д.м.н., профессор, зав. кафедрой биологической химии, Белорусский государственный медицинский университет;

Д.А. Макаревич – к.б.н., ведущий научный сотрудник научно-исследовательской части, Белорусский государственный медицинский университет.

Information about authors:

T.V. Ryabtseva – research officer of the Research Department, postgraduate of the Chair of Biological Chemistry, Belarusian State Medical University

E-mail: ta-yana@yandex.ru – Tatyana V. Ryabtseva;

A.D. Tahanovich – Doctor of Medical Sciences, professor, head of the Chair of Biological Chemistry, Belarusian State Medical University;

D.A. Makarevich – Candidate of Biological Sciences, leading researcher of the Research Department, Belarusian State Medical University.