

## Использование левамизола для блокирования кишечной формы щелочной фосфатазы при проведении иммуногистохимических реакций

*Н.А. Олейникова, О.А. Харлова, Н.В. Данилова, И.А. Михайлов, П.Г. Мальков*

ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

**Введение.** Проведение иммуногистохимических реакций непрямым методом с хромогенной меткой требует использования ферментов, одним из которых является щелочная фосфатаза (ЩФ). ЩФ присутствует в тканях организма и может расщеплять молекулы иммуногистохимического субстрата, что приводит к выраженному фоновому окрашиванию. Для уменьшения этого эффекта перед постановкой иммуногистохимической реакции необходимо заблокировать эндогенные ферменты. Одним из способов блокировки эндогенной щелочной фосфатазы является использование растворов левамизола. Цель данной работы – описать методику использования левамизола для блокирования кишечной формы щелочной фосфатазы при проведении иммуногистохимических реакций.

**Материалы и методы.** В статье приводится расчет получения 0,001М рабочего раствора левамизола из 10% официального ветеринарного препарата гидрохлорида левамизола производства Livisto Invesa Industrial Veterinaria S.A., Испания. Проверка инактивации кишечной формы ЩФ проводилась при постановке реакции с одним маркером (PDGFRb) и двумя маркерами (FAP и SMA) на материале рака толстой кишки. Для выявления двух маркеров на одном срезе нами был использован набор фирмы Abcam ab210061 DoubleStain IHC Kit: M&R on human tissue (HRP/Green&AP/Red, Великобритания) по методике, рекомендованной производителем, с некоторыми изменениями.

**Результаты.** При проведении иммуногистохимической реакции достигнуты полное отсутствие фонового окрашивания и яркая контрастная реакция с антителами (как с одним, так и с двумя на одном срезе) с использованием 1мМ левамизола, что свидетельствует о достаточной инактивации кишечной изоформы ЩФ в материале рака толстой кишки. Проведенный сравнительный анализ затрат на стекло при использовании готовых коммерческих блокирующих реагентов и официального раствора левамизола показывает значительную экономическую выгоду последнего.

**Заключение.** Высокое качество реакции и большая экономическая выгода открывают возможности к применению 1мМ раствора левамизола в практической лабораторной диагностике и научной работе при проведении иммуногистохимических исследований.

**Ключевые слова:** левамизол, иммуногистохимия, щелочная фосфатаза

**Для корреспонденции:** Нина Александровна Олейникова. E-mail: ale\_x\_05@mail.ru

**Для цитирования:** Олейникова Н.А., Харлова О.А., Данилова Н.В., Михайлов И.А., Мальков П.Г. Использование левамизола для блокирования кишечной формы щелочной фосфатазы при постановке иммуногистохимических реакций. Клини. эксп. морфология. 2020;9(3):74–79. DOI:10.31088/CEM2020.9.3.74-79

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ, грант «Перспектива» № 19-315-60006) и с использованием оборудования, приобретенного по программе развития МГУ имени М.В. Ломоносова до 2020 года.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 12.05.2020. Получена после рецензирования 17.06.2020. Принята в печать 29.06.2020.

## Levamisole usage for the block of intestinal alkaline phosphatase in immunohistochemical staining

*N.A. Oleynikova, O.A. Kharlova, N.V. Danilova, I.A. Mikhailov, P.G. Malkov*

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

**Introduction.** Immunohistochemical staining by an indirect method with a chromogenic label requires enzymes, among which is alkaline phosphatase (AP). AP is also present in human tissues. It can break down the molecules of the immunohistochemical substrate, which leads to significant background staining. It is necessary to block endogenous enzymes prior to immunohistochemical staining to reduce this effect. One

of the ways to block endogenous alkaline phosphatase is to use levamisole solutions. The aim of the study was to describe the technique of levamisole use to block the alkaline phosphatase intestinal form during immunohistochemical assays.

*Materials and methods.* This article provides the calculations for 0.001M working levamisole solution preparation from a 10% officinal veterinary levamisole hydrochloride produced by Livisto Invesa Industrial Veterinaria S. A., Spain. The inactivation of AP intestinal form was checked by a reaction with one marker (PDGFRb) and two markers (FAP and SMA) on the colon cancer specimens. We used the Abcam ab210061 DoubleStain IHC Kit: M&R on human tissue (HRP/Green&AP/Red, Great Britain) according to the method recommended by the manufacturer with some changes to identify two markers on the same slide.

*Results.* During the immunohistochemical assay, a complete absence of background staining and a bright contrast reaction with antibodies (both with one and two in the same section) using 1mM levamisole was achieved. It indicates sufficient inactivation of the AP intestinal isoform in the colon cancer specimens. A comparative cost-benefit analysis for one slide using ready-to-use commercial blocking reagents and officinal levamisole solution shows a significant economic advantage of the latter.

*Conclusion.* The high reaction quality and the palpable economic profits open up opportunities for using 1mM levamisole solution for immunohistochemical studies in laboratory practice and research work.

**Keywords:** levamisole, immunohistochemistry, alkaline phosphatase

**Corresponding author:** Nina A. Oleynikova. E-mail: ale\_x\_05@mail.ru

**For citation:** Oleynikova N.A., Kharlova O.A., Danilova N.V., Mikhailov I.A., Malkov P.G. Levamisol usage for the block of intestinal alkaline phosphatase in immunohistochemical staining. Clin. exp. morphology (In Russ.). 2020;9(3):74–79. DOI:10.31088/CEM2020.9.3.74-79

**Funding.** The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR, Perspektiva grant No. 19-315-60006) and using equipment purchased under the development program of Lomonosov Moscow state University until 2020.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Received** 12.05.2020. **Received in revised form** 17.06.2020. **Accepted** 29.06.2020.

## Введение

Проведение иммуногистохимических реакций прямым методом с хромогенной меткой требует использования ферментов. Чаще всего в качестве ферментной метки используются пероксидаза хрена (horseradish peroxidase, HRP), щелочная фосфатаза (ЩФ, alkaline phosphatase, AP) и глюкозооксидаза [1]. Аналогичные ферменты имеются и в тканях организма.

Так, ЩФ – димерный фермент, катализирующий гидролиз фосфоэстераз. У человека существует как минимум четыре типа ЩФ: кишечная (intestinal), плацентарная (placental), зародышевая (germ) и неспецифическая (кости, печень, почки) [2]. Изначально предполагалось, что кишечная изоформа ЩФ экспрессируется преимущественно в тонкой кишке, однако позднее было установлено, что экспрессия кишечной изоформы также в значительной степени характерна и для других органов: экзокринной части поджелудочной железы, коркового слоя почки и ткани печени [3]. Более того, на крысиной модели было установлено, что экспрессия кишечной изоформы ЩФ резко увеличена в аденокарциномах проксимальных и дистальных отделов толстой кишки по сравнению с практически полным отсутствием экспрессии данной изоформы в нормальной ткани толстой кишки [4].

Известно, что аминокислотная последовательность кишечной изоформы ЩФ только на 56,6% идентична последовательности аминокислот неспецифической ЩФ и на 86,5% идентична плацентарной изоформе

ЩФ [5]. Каждая из ЩФ может расщеплять молекулы иммуногистохимического субстрата, в результате чего появляется нежелательное выраженное фоновое окрашивание. Для устранения этого эффекта перед постановкой иммуногистохимической реакции необходимо инактивировать эндогенные ферменты. Для блокировки активности эндогенной пероксидазы применяют различные реактивы на основе перекиси водорода, широко доступные на коммерческом рынке. Для блокировки ЩФ могут быть использованы 20% уксусная кислота, но она повреждает ткани [6], L-аргинин, теофиллин, левамизол, а также производные пурина, пиримидина, тиазола и других гетероциклов [7], используемые в готовых к употреблению коммерческих растворах на рынке. Однако они труднодоступны, не входят в большинство наборов систем детекции, а их цена достаточно высока. В связи с этим нами был протестирован 10% раствор левамизола гидрохлорида производства Livisto Invesa Industrial Veterinaria S.A. (S, РУ 724-3-9.14-2366, № ПВИ-3-3.9/02832), применяемый в ветеринарии в качестве противоглистного препарата для крупного рогатого скота.

Левамизол ((6S)-6-фенил-2,3,5,6-тетрагидроимидазо[2,1-b][1,3]тазол) – гетероциклическое соединение, производное тиазола, которое является обратимым неконкурентным ингибитором большинства изоформ ЩФ, что впервые было установлено в 1976 году [8]. Левамизол обратимо связывается с гистидином-434 и тирозином-371 в активном центре неспецифической

изоформы ЩФ (рис. 1) [9]. В кишечной изоформе ЩФ гистидин-434, который необходим для связывания левамизола, в активном центре заменен на остаток серина, что и приводит к снижению ингибирующей активности левамизола [9]. Если концентрация полумаксимального ингибирования (IC50) неспецифической ЩФ для левамизола составляет 23,2 мкмоль/л при pH 7,8, то в случае кишечной изоформы ЩФ аналогичный показатель составляет более 400 мкмоль/л при pH 7,8 [10].

Так как левамизол является обратимым ингибитором, его связывание с аминокислотными остатками в активном центре ЩФ опосредовано нековалентными взаимодействиями, а именно водородными связями, сила которых напрямую зависит от pH среды, что объясняет двукратное снижение активности левамизола в сильнощелочной среде [2].

Молекулярный механизм каталитической реакции с участием ЩФ общий для всех изоформ фермента. Исходная катализируемая реакция ЩФ (обозначена как E на рис. 2) состоит из стадии связывания субстрата (DO-Pi), переноса фосфатного фрагмента в активный центр на остаток серина и выделения спиртового продукта реакции (DOH). Во второй части реакции фосфат высвобождается в результате гидролиза ковалентного промежуточного соединения (E-Pi) и диссоциации неорганического фосфата из нековалентного комплекса (E·Pi). В зависимости от происхождения фермента и точных условий реакции либо гидролиз E-Pi, либо выделение фосфата из E-Pi ограничивает скорость, что приводит к повышенной относительной концентрации E-Pi и E·Pi [11].

В молекуле левамизола атом азота, несущий двойную связь, является аналогом фосфата, который встраивается в активный центр фермента и нековалентно взаимодействует преимущественно с остатком гистидина-434 (в случае неспецифической изоформы ЩФ) [5]. Далее срабатывает типичный механизм обратимого неконкурентного ингибирования: образовавшийся фермент – субстратный комплекс не может перейти в исходное состояние, так как не происходит гидролиза фосфата.

**Материалы и методы**

Проверка инактивации кишечной формы ЩФ 10% раствором левамизола гидрохлорида производства Livisto Invesa Industrial Veterinaria S.A. (Испания) проводилась при постановке реакции с одним маркером (PDGFRb) и двумя маркерами (FAP и SMA) на материале рака толстой кишки. Для выявления двух маркеров на одном срезе нами был использован набор

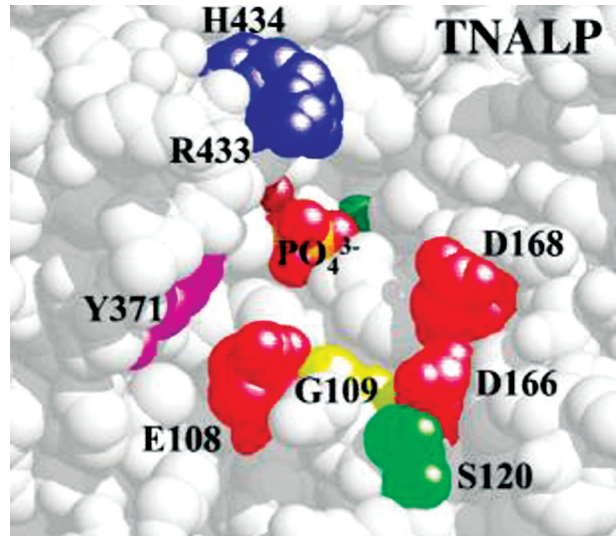


Рис. 1. Область активного центра неспецифической щелочной фосфатазы (TNALP – tissue nonspecific alkaline phosphatase) [9]. Ключевые аминокислотные остатки окрашены в соответствии с их химическими свойствами: синий – основные, красный – кислотные, фиолетовый – ароматические, желтый – алифатические, зеленый – незаряженный полярный. Атом цинка показан оранжевым, магний – зеленым, а фосфатный фрагмент – желтым и красным

Fig. 1. Active site region of human tissue nonspecific alkaline phosphatase (TNALP) [9]. The highlighted residues are colored according to their chemical properties: blue – basic, red – acidic, violet – aromatic, yellow – aliphatic, and green – uncharged polar. The zinc atom is shown in orange, the magnesium is in green, and the phosphate moiety is indicated by yellow and red color

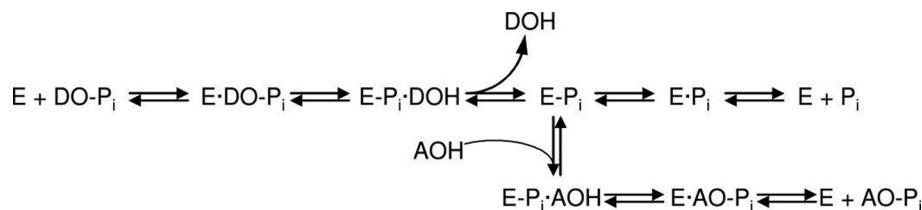


Рис. 2. Каталитический механизм реакции щелочной фосфатазы [10].

Сокращения: E – молекула щелочной фосфатазы, DO-Pi – молекула субстрата, E-Pi – фосфофермент (фермент, фосфорилированный по остатку Ser-93 в активном центре), DOH – спиртовой продукт реакции, E·Pi – нековалентный комплекс неорганического фосфата в активном центре

Fig. 2. Catalytic mechanism of alkaline phosphatase reaction [10].

Abbreviations: E – alkaline phosphatase enzyme molecule, DO-Pi – substrate molecule, E-Pi – phosphoenzyme (enzyme phosphorylated on Ser-93 in the TNAP sequence of its active site), DOH – product alcohol, E·Pi – non-covalent complex of inorganic phosphate in the active site

фирмы Abcam ab210061 DoubleStain IHC Kit: M&R on human tissue (HRP/Green&AP/Red, Великобритания) по методике, рекомендованной производителем [12], с некоторыми изменениями.

С отобранных блоков изготавливали срезы толщиной 3–4 мкм, которые монтировали на предметные стекла с адгезивным покрытием (Polysine Slides, Menzel GmbH&Co KG, Германия). Депарафинирование, регидратацию и демаскировку антигенов проводили одновременно, перед блокировкой эндогенных ферментов при помощи буфера Dewax and HIER Buffer M (pH 8,0) (Thermo Scientific, США) при температуре 95–98°C, в течение 20 минут в модуле предобработки PT-Module (Thermo Scientific, США). Иммуногистохимические реакции проводили в полуавтоматическом режиме с использованием автостейнера Autostainer 480S (Thermo Scientific, США).

Фоновое окрашивание предотвращали путем блокирования эндогенных ферментов пероксидазы и ЩФ, используемых в качестве хромогенной метки в полимерных конструкциях вторых слоев. Для блокировки пероксидазы использовали готовый коммерческий раствор Hydrogen Peroxide Block в составе системы детекции Ultra Vision Quanto Detection System HRP DAB (Thermo Scientific, США) со временем инкубации 10 минут. Для блокировки ЩФ вместо готовых растворов для лабораторного использования применили 10% раствор левамизола гидрохлорида. Приводим расчеты получения 0,001М рабочего раствора левамизола (концентрация заведомо большая, для достоверной инактивации кишечной формы ЩФ).

### Результаты и обсуждение

В 1 мл официального 10% раствора содержится 100 мг ( $100 \times 10^{-3}$  г) левамизола гидрохлорида, имеющего молярную массу 240,5 г/моль. Расчет количества действующего вещества в 1 мл готового раствора:

$$\frac{100 \times 10^{-3}}{240,4} = 0,416 \times 10^{-3} \text{ моль.}$$

Исходя из целевой молярности (0,001М) и объема необходимого раствора (10 мл – объем виалы для автостейнера), составляем пропорцию и вычисляем необходимое количество молей (x):

$$\begin{aligned} & 1 \text{ л} - 0,001 \text{ моль,} \\ & 0,01 \text{ л} - x \text{ моль,} \\ \text{где } x &= \frac{0,01 \times 0,001}{1}, \\ & x = 1 \times 10^{-5} \text{ моль} \end{aligned}$$

Учитывая молярность исходного раствора ( $0,416 \times 10^{-3}$ ) и целевого на наш объем ( $10^{-5}$ ), составляем пропорцию и вычисляем необходимый для полу-

чения 10 мл рабочего раствора объем официального раствора (y):

$$\begin{aligned} & 1 \text{ мл} - 0,416 \times 10^{-3} \text{ моль} \\ & y \text{ мл} - 10^{-5} \text{ моль,} \\ \text{где } y &= \frac{10^{-5}}{0,416 \times 10^{-3}}, \\ & y = 0,024 \text{ мл (24 мкл).} \end{aligned}$$

Таким образом, для получения 10 мл раствора необходимо взять:

вода дистиллированная	9,976 мл,
10% раствор левамизола гидрохлорида	0,024 мл.

В автоматическом режиме в автостейнере последовательно проводились:

инкубация с Hydrogen Peroxide Block	10 минут,
инкубация с 0,001М раствором левамизола гидрохлорида	10 минут,
инкубация с антителами	30 минут,
полимеризация (mouse HRP + rabbit AP)	30 минут.

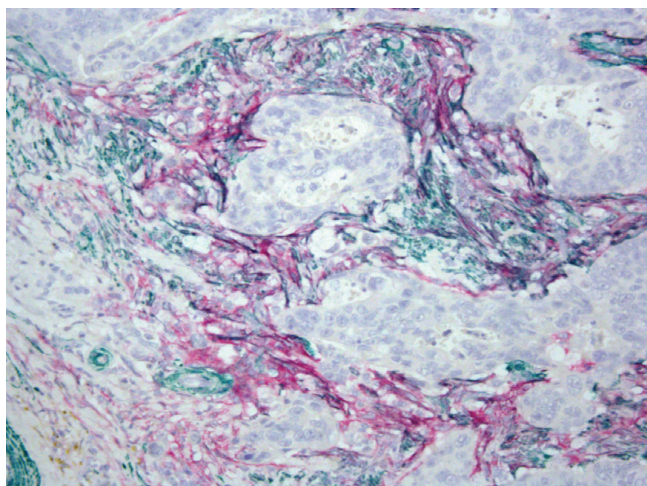
Окрашивание Permanent Red, гематоксилином и Emerald Chromogen осуществлялось в ручном режиме ввиду невозможности смешивания реагентов непосредственно в виале во время процедуры окрашивания в автостейнере. Окрашивание проводилось согласно инструкции производителя с последующим заключением срезов в специальную среду, входящую в набор.

Результаты окрашивания представлены на микрофотографиях, демонстрирующих полное исключение фонового окрашивания за счет блокирования эндогенной ЩФ 0,001М раствором левамизола гидрохлорида при постановке иммуногистохимических реакций с использованием технологий как хромогенной монометки (рис. 3), так и хромогенной мультиплексной метки (рис. 4).

Учитывая, что максимальный расход реагента на одно стекло – 200 мкл, полученного рабочего раствора объемом 10 мл хватит на 50 определений, а представленной в продаже упаковки официального 10% левамизола объемом 100 мл – на 208 332 стекла:

$$\begin{aligned} & 0,024 \text{ мл официального раствора} - 50 \text{ стекол,} \\ & 100 \text{ мл официального раствора} - z \text{ стекол,} \\ \text{где } z &= \frac{100 \times 50}{0,024}, \\ & z = 208 \text{ 332 стекла.} \end{aligned}$$

Сравнительный анализ стоимости использования 10% левамизола, готового к употреблению коммерче-



*Рис. 4.* Исключение фонового окрашивания за счет блокирования эндогенной щелочной фосфатазы 0,001М раствором левамизола. Иммуногистохимическое определение FAP (красный) и SMA (зеленый) в микропрепарате аденокарциномы толстой кишки,  $\times 200$

*Fig. 4.* Elimination of background staining by blocking endogenous alkaline phosphatase with 0.001M levamisole solution. Immunohistochemical assay for FAP (red) and SMA (green) in a colon adenocarcinoma,  $\times 200$

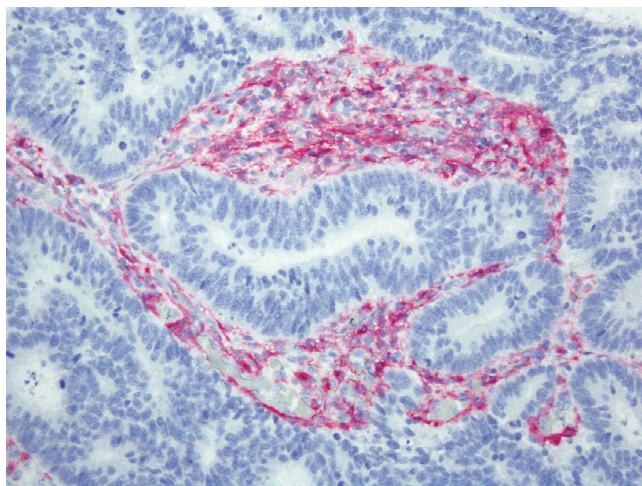
ского набора для блокирования эндогенной щелочной фосфатазы и набора для одномоментной блокировки пероксидазы и щелочной фосфатазы показал, что применение левамизола существенно (от нескольких раз до десятков тысяч раз) снижает затраты на проведение иммуногистохимической реакции.

### Заключение

Показана возможность применения 10% официального ветеринарного препарата левамизола гидрохлорида производства Livisto Invesa Industrial Veterinaria S.A. для инактивации кишечной формы ЩФ в аденокарциноме толстой кишки при постановке иммуногистохимических реакций. Взятая концентрация (1мМ) превышает концентрацию полумаксимального ингибирования (400 мкмоль/л) данной изоформы в 2,5 раза, за счет чего достигаются полное отсутствие фонового окрашивания и яркая контрастная реакция с антителами (как с одним, так и с двумя на одном срезе). Высокое качество реакции и большая экономическая выгода открывают возможности к применению 1мМ раствора левамизола в практической и научной работе при проведении иммуногистохимических исследований.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Н.А. Олейникова.  
Сбор и обработка материала – Н.А. Олейникова, О.А. Харлова, И.А. Михайлов.  
Написание текста – Н.А. Олейникова.  
Редактирование – О.А. Харлова, Н.В. Данилова, П.Г. Мальков.



*Рис. 3.* Исключение фонового окрашивания за счет блокирования эндогенной щелочной фосфатазы 0,001М раствором левамизола. Иммуногистохимическое выявление PDGFRa (красный) в микропрепарате аденокарциномы толстой кишки,  $\times 200$

*Fig. 3.* Elimination of background staining by blocking endogenous alkaline phosphatase with 0.001M levamisole solution. Immunohistochemical assay for PDGFRa (red) in a colon adenocarcinoma,  $\times 200$

### Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – N.A. Oleynikova.  
Collected the data and performed the analysis – N.A. Oleynikova, O.A. Kharlova, I.A. Mikhailov.  
Wrote the paper – N.A. Oleynikova.  
Edited the manuscript – O.A. Kharlova, N.V. Danilova, P.G. Malkov.

### Литература/References

1. Kierman JA. Histological and histochemical methods. Theory and practice. 4th ed. Banbury: Scion Publishing Ltd, 2008. 606 p.
2. Sergienko E, Su Y, Chan X, Brown B, Hurder A, Narisawa S et al. Identification and characterization of novel tissue-nonspecific alkaline phosphatase inhibitors with diverse modes of action. *J Biomol Screen.* 2009;14(7):824–37. DOI: 10.1177/1087057109338517.
3. Domar U, Nilsson B, Baranov V, Gerdes U, Stigbrand T. Expression of intestinal alkaline phosphatase in human organs. *Histochemistry.* 1992;98(6):359–64. DOI: 10.1007/BF00271071.
4. Yoshida K, Nakamura W, Hirano K, Yuasa H, Tsukamoto T, Tatematsu M. Expression of sucrase and intestinal-type alkaline phosphatase in colorectal carcinomas in rats treated with methylazoxymethanol acetate. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1998; 124(12):677–82. DOI: 10.1007/s004320050231.
5. Henthorn PS, Raducha M, Edwards YH, Weiss MJ, Slaughter C, Lafferty MA et al. Nucleotide and amino acid sequences of human intestinal alkaline phosphatase: close homology to placental alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84(5):1234–8. DOI: 10.1073/pnas.84.5.1234.
6. Bancroft JD, Gamble M (eds.). Theory and practice of histological techniques. 6th ed. New York: Churchill Livingstone, 2008. 760 p.

7. *al-Rashida M, Iqbal J.* Inhibition of alkaline phosphatase: an emerging new drug target. *Mini Rev Med Chem.* 2015;15(1):41–51. DOI: 10.2174/1389557515666150219113205.
8. *Van Belle H.* Alkaline phosphatase. I. Kinetics and inhibition by levamisole of purified isoenzymes from humans. *Clin Chem.* 1976;22(7):972–6.
9. *Kozlenkov A, Le Du MH, Cuniassse P, Ny T, Hoylaerts MF, Millan JL.* Residues determining the binding specificity of uncompetitive inhibitors to tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *J Bone Miner Res.* 2004;19(11):1862–72. DOI: 10.1359/JBMR.040608.
10. *Debray J, Chang L, Marquès S, Pellet-Rostaing S, Le Duy D, Mebarek S et al.* Inhibitors of tissue-nonspecific alkaline phosphatase: design, synthesis, kinetics, biomineralization and cellular tests. *Bioorg Med Chem.* 2013;21(24):7981–7. DOI:10.1016/j.bmc.2013.09.053
11. *Holtz KM, Stec B, Kantrowitz ER.* A model of the transition state in the alkaline phosphatase reaction. *J Biol Chem.* 1999;274(13):8351–4. DOI: 10.1074/jbc.274.13.8351.
12. Instruction to Abcam ab210061 DoubleStain IHC Kit: M&R on human tissue (HRP/Green&AP/Red). Available at: <https://www.abcam.com/doublestain-ihc-kit-mr-on-human-tissue-hrpgreen-apred-ab210061.html>.

### Информация об авторах

Нина Александровна Олейникова – кандидат медицинских наук, научный сотрудник отдела клинической патологии медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова, ассистент кафедры физиологии и общей патологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Ольга Андреевна Харлова – кандидат медицинских наук, научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории генных и клеточных технологий кафедры биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Наталья Владимировна Данилова – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела клинической патологии медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова, ассистент кафедры физиологии и общей патологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Илья Александрович Михайлов – студент 6-го курса факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Павел Георгиевич Мальков – доктор медицинских наук, заведующий отделом клинической патологии медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова, профессор кафедры физиологии и общей патологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

### Author information

Nina A. Oleynikova – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Department of Clinical Pathology, Medical Research and Educational Center, Lomonosov Moscow State University; Assistant Professor, Department of Physiology and Pathology, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University.

<http://orcid.org/0000-0001-8564-8874>

Olga A. Kharlova – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Gene and Cell Technology Laboratory, Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University.

<http://orcid.org/0000-0002-5909-1248>

Natalia V. Danilova – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Department of Clinical Pathology, Medical Research and Educational Center, Lomonosov Moscow State University; Assistant Professor, Department of Physiology and Pathology, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University.

<http://orcid.org/0000-0001-7848-6707>

Ilya A. Mikhailov – 6<sup>th</sup> year Student, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University.

<http://orcid.org/0000-0001-8020-369X>

Pavel G. Malkov – Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Clinical Pathology, Medical Research and Educational Center, Lomonosov Moscow State University; Professor, Department of Physiology and Pathology, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University.

<http://orcid.org/0000-0001-5074-3513>