

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ НОВОЙ ТРАНСГЕННОЙ ГУМАНИЗИРОВАННОЙ ПО *HLA-A*02:01:01:01* И *hβ2m* ЛИНИИ МЫШЕЙ

Н.Н. Каркищенко, Е.С. Глотова*, Н.В. Петрова, В.В. Слободенюк, Н.А. Ларюшина,
Д.В. Петров, И.А. Васильева, К.Е. Дерябин

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

Создание новой гуманизированной трансгенной линии мышей-биомоделей, несущих ген *HLA-A*02:01:01:01*, требует разработки эффективного метода верификации наличия целевого трансгена в геноме животных. Нами была разработана система генетического скрининга животных на основе метода ПЦР в реальном времени и высокоспецифичных праймеров, позволяющих детектировать все функционально значимые части генетической конструкции. Кроме того, методом секвенирования по Сэнгеру было показано отсутствие химеризма и полное соответствие первичной нуклеотидной последовательности трансгена *HLA-A*02:01:01:01* заявленной генно-инженерной конструкции и гену *HLA-A*02:01:01:01* человека. По результатам селекционно-генетической работы с полученными трансгенными животными были определены три наиболее перспективные сублинии, которые используются для выведения новой линии гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген *HLA-A*02:01:01:01*.

Ключевые слова: ПЦР в реальном времени, секвенирование по Сэнгеру, верификация трансгена, *HLA A*02:01:01:01*, селекционно-генетическая работа

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках Государственного задания «Создание трансгенных гуманизированных биомоделей с интегрированными генами *HLA-A*02:101βt* русского человека» (шифр: «Трансгеноз-2021»).

Для цитирования: Каркищенко Н.Н., Глотова Е.С., Петрова Н.В., Слободенюк В.В., Ларюшина Н.А., Петров Д.В., Васильева И.А., Дерябин К.Е. Генетический скрининг новой трансгенной гуманизированной по *HLA-A*02:01:01:01* и *hβ2m* линии мышей. *Биомедицина*. 2023;19(3E):10–24. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-10-24>

Поступила 10.04.2023

Принята после доработки 17.07.2023

Опубликована 06.11.2023

GENETIC SCREENING OF A NEW TRANSGENIC MOUSE LINE HUMANIZED FOR *HLA-A*02:01:01:01* AND *hβ2m*

Nikolay N. Karkischenko, Elena S. Glotova*, Nataliya V. Petrova,
Vladimir V. Slobodenyuk, Nadezhda A. Laryushina, Dmitry V. Petrov, Irina A. Vasil'eva,
Kirill E. Deryabin

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

The development of new humanized transgenic mouse biomodels with the *HLA-A*02:01:01:01* gene requires effective methods for target transgene verification in the animal genome. In the present study, we

develop a system for genetic screening of animals based on real-time PCR and using highly specific primers to detect all functionally significant parts of the genetic construct. In addition, the Sanger sequencing method showed the absence of chimerism and complete correspondence between the primary nucleotide sequence of the *HLA A*02:01:01:01* transgene and the developed engineered genetic construct and human gene *HLA A*02:01:01:01*. Based on the results of selection and genetic works with the resulting transgenic animals, three most promising sublines were identified. These lines are currently used for breeding a new line of humanized transgenic mice with the *HLA-A*02:01:01:01* gene.

Keywords: real-time PCR, Sanger sequencing, transgene verification, *HLA-A*02:01:01:01*, selection and genetic work

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: the work was carried out within the framework of the State assignment “Creation of transgenic humanized biomodels with integrated *HLA-A*02:101 βt* genes of the Russian human” (code: “Transgenosis-2021”).

For citation: Karkischenko N.N., Glotova E.S., Petrova N.V., Slobodenyuk V.V., Laryushina N.A., Petrov D.V., Vasil'eva I.A., Deryabin K.E. Genetic Screening of a New Transgenic Mouse Line Humanized for *HLA-A*02:01:01:01* and *hβ2m*. *Journal Biomed.* 2023;19(3E):10–24. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-10-24>

Submitted 10.04.2023

Revised 17.07.2023

Published 06.11.2023

Введение

Современные тенденции развития биомедицинских исследований диктуют новые требования по дизайну эксперимента, что преследует цель повышения качества и трансляционности получаемых результатов. Одним из ключевых моментов качественного исследования является выбор адекватной биомодели, максимально точно соответствующей задачам исследования. Однако с накоплением научных знаний исследователи сталкиваются с проблемой несоответствия существующих биомodelей актуальным данным, что осложняет дальнейшую работу и ставит под сомнение полученные результаты. Таким образом, важнейшей задачей современного биомоделирования является разработка и валидация актуальных биомodelей, отвечающих современным стандартам и критериям качества, применяемым в сфере биомедицинских исследований.

Особую роль среди биомodelей имеют гуманизированные животные. На сегодня биомodelи, несущие гены человека, широко применяются для широкого спектра

исследований в различных областях науки. Анатомическая, физиологическая, нейро-биологическая и метаболическая аналогии [9, 14, 16, 22] основных животных биомodelей (мыши, крысы, мини-пиги [7, 10, 17, 23]) позволяют с высокой степенью достоверности моделировать различные патологические состояния человека, вплоть до создания биомodelей, воспроизводящих особенности конкретного человека. Совершенствование молекулярно-генетических методов редактирования генома (CRISPR/Cas9, ZFNs, TALENs) позволяет в короткие сроки получить биомodelь с заданными свойствами, отвечающую задачам исследования. Кроме того, неоспоримым преимуществом некоторых модельных животных (крысы, мыши) является возможность проследить возможные побочные эффекты в ряде поколений, что особенно важно для тестирования и контроля качества препаратов генной терапии [12].

Создание новых биомodelей тесно связано с необходимостью разработки современных методов для верификации модели и контроля качества вновь создаваемых

линий животных. Учитывая случайный механизм встраивания трансгена *HLA-A*02:01:01:01*, его интеграция может внести изменения в транскрипционную и функциональную активность региона встраивания [15] вплоть до нарушения работы собственных генов организма [19] или активации онкогенов [13], так же как и окружающая ДНК может привести к неконтролируемой экспрессии трансгена [23]. Тщательный генетический скрининг поголовья животных позволяет не только контролировать наследуемость интересующего признака, но и проводить эффективный отбор особей по различным критериям, таким как плодовитость и репродуктивный потенциал, сила экспрессии трансгена, отсутствие побочных эффектов, наличие мутаций и генетических перестроек и пр. Контроль генетической чистоты и отбор наиболее перспективных особей и сублиний для размножения являются предметом селекционно-генетической работы с новой линией животных биомоделей.

Как было описано ранее [6], нами были получены родоначальники новой гуманизированной трансгенной линии мышей-биомоделей, несущие ген *HLA-A*02:01:01:01*. Животные были получены методом микроинъекций линейного фрагмента (рис. 1) генно-инженерной конструкции (ГИК) в мужской пронуклеус зигот с последующим переносом потенциально модифицированных эмбрионов в репродуктивный тракт псевдобеременным самкам-реципиентам. Созданная ГИК кодирует химерную молекулу главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I на поверхности клеток, состоящую из, $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - доменов HLA человека и $\alpha 3$ -домена комплекса H 2K мыши, стабилизированную β_2 -микроглобулином человека, соединённым глицин сериновым линкером с $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - доменами HLA. Данная биомодель может успешно применяться для решения широкого спектра исследовательских задач, включая исследования

иммунных реакций, инфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваний, а также разработки и тестирования вакцин и исследования в области фармакобезопасности и иммуногенности.

Целью настоящей **работы** было создание методики верификации трансгена *HLA-A*02:01:01:01* у полученных животных новой гуманизированной трансгенной линии и подтверждение соответствия нуклеотидной последовательности трансгена заявленной ГИК и гену *HLA-A*02:01:01:01* человека, а также селекционно-генетическая работа с животными новой линии.

Материалы и методы

Экспериментальные животные

Для проведения селекционно-генетической работы использовались самки и самцы новой гуманизированной трансгенной линии мышей с интегрированным геном *HLA-A*02:01:01:01* поколений F0–F3, полученные в ФГБУН «НЦБМТ ФМБА России», а также гибридные мыши линии CBA/лс×C57Bl/6 (F1), полученные из филиала «Столбовая» ФГБУН «НЦБМТ ФМБА России». Животные содержались в системе индивидуальных вентилируемых клеток при световом режиме 12/12 со свободным доступом к еде и воде. Для получения F1 трансгенные особи F0 скрещивались с половозрелыми животными линии CBA/лс×C57Bl/6 (F1), а для получения F2 и следующих поколений племядра формировали из подтверждённых особей предыдущего поколения по технологии инбредного скрещивания.

Биоматериал для генетического анализа

Материалом для исследования присутствия трансгена *HLA-A*02:01:01:01* у мышей служили биоптаты хвоста. Для анализа пробы брали у всех животных, достигших возраста 3 недели.

Для определения нуклеотидной последовательности трансгена и степени химе-

ризма использовали лейкоциты из цельной крови, а также биоптат внутренних органов взрослого животного — носителя гена *HLA-A*02:01:01:01*.

Выделение РНК

Получение препаратов РНК проводили с использованием набора реагентов РИБО сорб («AmpliSens», Россия) согласно инструкции производителя. Готовые растворы РНК хранили при температуре не выше +16°C не более 1 мес.

Обратная транскрипция

Получение кДНК для последующего анализа методом ПЦР проводили с использованием комплекта реагентов РЕВЕРТА-Л («AmpliSens», Россия) согласно инструкции производителя. Готовый препарат кДНК хранится при температуре не выше минус 16°C в течение 1 недели или при температуре не выше минус 68°C в течение года.

Подбор праймеров

Для определения нуклеотидной последовательности праймеров было использовано программное обеспечение Vector NTI («ThermoFisher Scientific») и база данных BLAST. Синтез праймеров — «ДНК синтез» (Россия).

ПЦР в реальном времени

РВ-ПЦР проводили с использованием флуоресцентных зондов и специфических праймеров («ДНК синтез», Россия) на амплификаторе CFX-96 («Bio-Rad», США).

Классическая ПЦР

Реакцию проводили с использованием высокоспецифичных праймеров («ДНК синтез», Россия) на амплификаторе («ДНК Технология», Россия). Продукт ПЦР использовали для секвенирования по Сэнгеру.

Секвенирование по Сэнгеру

Процедуру проводили с использованием прямых и обратных праймеров на секвенаторе Genetic Analyser 3500 («Applied Biosystems»). Обработку полученных результатов и сравнение и выравнивание последовательностей проводили с помощью программного обеспечения Vector NTI

(«ThermoFisher Scientific») и онлайн-модуля BLAST Align (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi>).

Результаты и их обсуждение

Дизайн системы верификации трансгена *HLA-A*02:01:01:01* методом ПЦР в реальном времени

ПЦР в реальном времени — это семейство методик количественной ПЦР со следующими чертами: а) определение выхода продукта реакции после каждого цикла амплификации; б) построение по этим данным кинетической кривой PCR; в) определение относительной концентрации субстрата на основании анализа этой кривой. Для детекции ПЦР-продукта используются флуоресцентные метки, обеспечивающие флуоресценцию, прямо пропорциональную количеству ПЦР продукта — репортерную флуоресценцию. Данный метод позволяет точно и в короткий срок выявить нужную нуклеотидную последовательность в препаратах геномной ДНК или кДНК.

Для получения гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген *HLA-A*02:01:01:01* и презентующих гибридные молекулы HLA класса I на поверхности клеток, была использована генно-инженерная конструкция СВН b2m A0201 h2k (структурные элементы представлены в табл. 1), линейаризованный фрагмент (рис. 1) которой был внесён в мужской пронуклеус зигот мышей-доноров C57Bl/6Y×CBA/лас. Гибридная молекула MHC класса I представляет собой белок, содержащий β₂-микроглобулин человека, слитый с α1- и α2-доменами *HLA-A*02:01:01:01*, и α3-домен Н 2К мыши (трансмембранная и цитоплазматическая части).

Нами осуществлен биоинформационный анализ последовательностей целевых участков ГИК с помощью базы NCBI, специфичных для отбора наиболее перспективных нуклеотидных последовательностей для использования в синтезе

Таблица 1. Структура генной конструкции CBH-b2m-A0201-h2k
Table 1. Structure of gene construct CBH-b2m-A0201-h2k

Фрагмент	Описание	Размер, п.н.
CBH	промотор	796
β_2m человека	кДНК β_2 -микроглобулина человека	402
Линкер (Гли4 Сер1) x3	линкер	45
Фрагмент HLA-A0201	фрагмент кДНК МНС I HLA- A*02:01:01:01 класса человека (домены $\alpha 1$, $\alpha 2$)	540
Фрагмент h2k	фрагмент кДНК МНС I класса мыши: домен $\alpha 3$ H-2K, трансмембранный и цитозольный фрагменты	501
WPRE	посттрансляционный регуляторный элемент	676
TK-PA-terminator	сигнал полиаденилирования	271

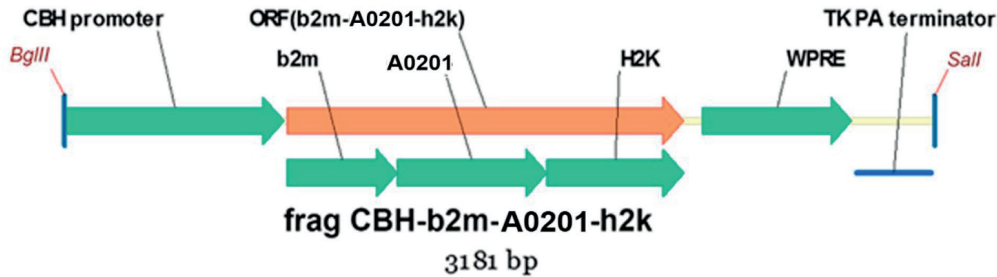


Рис. 1. Схема линейного фрагмента frag CBH-b2m_A0201-h2k ДНК, предназначенного для микроинъекций.
Fig. 1. Scheme of a linear DNA fragment frag CBH-b2m_A0201-h2k for microinjection.

Таблица 2. Наборы праймеров для детекции структурных фрагментов генной конструкции CBH-b2m-A0201-h2k у трансгенных мышей методом РВ-ПЦР
Table 2. Sets of primers for detection of structural fragments of the CBH-b2m-A0201-h2k gene construct in transgenic mice using RT-PCR

	Праймер	Последовательность, 3'-5'	Положение в трансгене
1	hb2m F	TCACGTCATCCAGCAGAGAA	hb2m
	hb2m R	CGTCATGTCTCGATCCCACT	
	hb2m Z	ROX -CCATCCGACATTGAAGTTGACTTAC-BHQ-2	
2	H2K F	GGAGAAACACAGGTGGAAA	3'- фрагмент H2K
	H2K R	ACGGGAAGCAATAGCATGA	5'- фрагмент H2K
	H2K Z	ROX -CTCTCCCAGATTGTAAAGTGATGGT-BHQ-2	
3	CBH F	5-TTACTCCCACAGGTGAGCG-3	CBH
	CBH R	5-AGCGAGACATGGTGGCTCT-3	
	CBH Z	ROX -CTGAGCAAGAGGTAAGGGTTTAAGG-BHQ-2	
4	WPRE F	5-GACGAGTCGGATCTCCCTT-3	WPRE
	WPRE R	5-TATCGACAGAGTGCCAGCC-3	
	WPRE Z	ROX -TAACTGAAACACGGAAGGAGACAAT-BHQ-2	

праймеров и флуоресцирующего зонда. В табл. 2 представлены нуклеотидные последовательности наиболее оптимальных праймеров и флуоресцентных зондов

для эффективной и высокоспецифичной детекции компонентов ГИК.

Для детекции наличия целевой модификации в геноме новой линии мышей —

Таблица 3. Олигонуклеотидные последовательности прямого и обратного праймера и флуоресцентного зонда для детектирования трансгена HLA-A*02:01:01:01

Table 3. Oligonucleotide sequences of forward and reverse primers and fluorescent probe for detecting the HLA-A*02:01:01:01 transgene

Название праймера/зонда	Олигонуклеотидная последовательность
b2mF	5'- TCCAGCGTACTCCAAAGATTCCAGGT-3'
02R1	5'-GTCAACTCTGTGGGTCTGACTGTGAGCTTTTCAC-3'
H B2mF	5'-TCACGTCATCCAGCAGAGAA -3'
H B2mR	5'-CGTCATGTCTCGATCCCACT-3'
H B2m Z (зонд)	ROX -CCATCCGACATTGAAGTTGACTTAC-BHQ-2

трансгена *HLA-A*02:01:01:01* — были подобраны и оптимизированы пары праймеров и флуоресцентный зонд, представленные в табл. 3. С помощью первой пары можно верифицировать модификацию генома у полученных животных, подтверждая наличие аллель-специфической характеристики, тогда как вторая пара праймеров дает ответ на наличие человеческого β_2 -микроглобулина.

Стадию амплификации участка гена *HLA-A*02:01:01:01* в режиме реального времени предполагается проводить в 25 мкл смеси на детектирующем амплификаторе CFX-96 («Bio-Rad», США).

Состав реакционной смеси:

- ПЦР-буфер ($\times 10$): 700 мМТрис-HCl, pH 8,6 / 25°C, 166 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
- 25 мМ MgCl_2 ,
- 0,2 мМdNTPs,
- Taq-полимераза.

Предполагаемые условия проведения амплификации: начальная денатурация при 95°C — 15 мин, затем 50 циклов: 94°C — 30 сек., 58°C — 30 сек., 72°C — 30 сек.

Разработанная методика верификации трансгена *HLA-A*02:01:01:01* у мышей новой линии позволяет быстро, качественно и однозначно определить наличие целевой модификации генома. Относительная простота и доступность реактивов и оборудования позволяют в короткие сроки провести генетический скрининг поголовья животных для дальнейшей селекционно-генетической работы по выведению чистой линии или иных целей.

Дизайн системы для ПЦР детекции структурных фрагментов генной конструкции СВН-b2m-A0201-h2k у трансгенных мышей методом определения размеров амплификатов

ПЦР в реальном времени позволяет быстро и качественно определить наличие трансгена в тканях и органах, однако метод позволяет получить достаточно короткие ампликоны (как правило, около 200 п.н.) и не позволяет определять достаточно протяжённые участки генома. Для определения точной первичной последовательности ГИК в геноме мышей была разработана методика получения ампликонов, кодирующих основные функциональные части трансгена, с применением метода классической ПЦР. В табл. 4 представлены праймеры, используемые для классической ПЦР, а на рис. 2 — схема детекции основных функциональных частей ГИК.

Полученные таким образом ампликоны могут быть использованы в дальнейшем как для верификации наличия трансгена методами электрофоретического фракционирования ДНК и определения размера ампликонов, так и служить материалом для определения точной нуклеотидной последовательности методом секвенирования по Сэнгеру.

Подтверждение соответствия трансгена HLA-A*02:01:01:01 заявленной ГИК методом секвенирования по Сэнгеру

Секвенирование является одним из ключевых методов в арсенале молекулярной би-

Таблица 4. Праймеры для ПЦР детекции структурных фрагментов генной конструкции CBH-b2m-A0201-h2k*
Table 4. Primers for PCR structural fragments detection of the CBH-b2m-A0201-h2k construct*

№	Праймер	Последовательность 5'-3'	Соответствие ГИК	Размер, п.н
1	hb2mF1	TCCAGCGTACTCCAAAGATTCAGGT	b2m	372
	tgR02	TGGTGAAGAAGTACCTCATGC	HLA-A0201**	
2	b2mF	TGCCTGCCGTGTGAACCATGTGACT	b2m	780
	m4ExR	AGCTCCTCCCCATTCAACTGCCA	H2K ^k	
3	H2K-F	TGTGATGAAGATGAGAAGGAGAAACA	H2K ^k	340
	WPRE-R	TCATAAAGAGACAGCAACCAGGATT	WPRE	

Примечание: * — см. схему детекции, рис. 2; ** — праймер, высокоспецифичный для HLA-0201.

Note: * — see diagram of detection, fig. 2; ** — primer, highly specific for the HLA-0201.

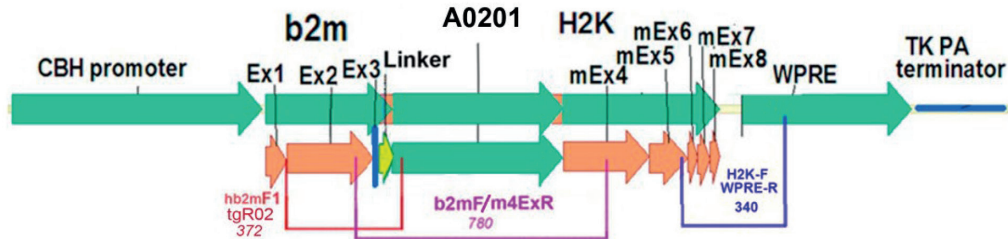


Рис. 2. Схема детекции структурных элементов конструкции CBH-b2m-A0201-h2k в геномном материале, выделенном из биологических образцов трансгенных мышей, несущих ген HLA-A*02:01:01:01.

Fig. 2. Scheme for structural elements detection of a CBH-b2m-A0201-h2k construct in genomic material isolated from biological samples of transgenic mice with the HLA-A*02:01:01:01 gene.

ологии, который позволяет точно установить первичную последовательность нуклеотидов в цепочке ДНК. Полученные при этом первичные данные с помощью специальных программ и анализа методами биоинформатики могут быть использованы для картирования ДНК, поиска последовательностей и других целей. В нашем случае использование данного метода позволяет подтвердить правильность нуклеотидной последовательности трансгена *HLA-A*02:01:01:01* и её соответствие заявленной ГИК и соответствующему гену человека.

В качестве матрицы для секвенирования мы использовали кДНК, полученную из выделенного препарата мРНК образцов ткани внутренних органов и лимфоцитов крови мышей, несущих ген *HLA-A*02:01:01:01*. Выбор кДНК обоснован тем, что данной

процедурой мы подтверждаем не просто наличие гена в геноме животного, но и активный синтез нашей конструкции в клетках, т. е. транскрипционную активность трансгена, что может косвенно свидетельствовать о функциональной активности конечного продукта — гибридной молекулы МНС класса I на поверхности клеток.

Сравнение нуклеотидных последовательностей трансгена *HLA-A*02:01:01:01* из разных органов проводили выравниванием полученных сиквенсов относительно заявленной нуклеотидной последовательности генно-инженерной конструкции, а также гена *HLA-A*02:01:01:01* человека. Секвенирование проводили с использованием и прямых, и обратных праймеров.

На рис. 3 и 4 представлен пример сиквенса с прямым праймером нуклеотидной последо-

вательности трансгена *HLA-A*02:01:01:01*, крови (рис. 3а, 4а) и селезёнки (рис. 3б, 4б), полученной из образцов иммунокомпетентных органов и тканей — лимфоцитов с цветовым обозначением функциональных частей.

TKCAGATGTTA GTGGGATCGAGACATGACGCGT GGTGGAGGTGGCAGTGGAGGTGGAG
GCTCTGGTGGTGGAGGATCT CACAGCATGAGGTACTTCTTCACCAGCGTGTCCAGACCT
GGCAGAGGTGAACCCAGGTTTCATTGCCGTTGGCTACGTGGACGACACCCAGTTCGTTTCG
CTTCGACAGCGATGCTGCAAGTCAGAGGATGGAACCGAGAGCACCCCTGGATCGAGCAG
GAAGGTCCTGAGTACTGGGATGGAGAGACCAGGAAGGTGAAAGCTCACAGTCAGACCC
ACAGAGTTGACCTTGGAACTGAGAGGCTACTACAACCAAGTCTGAGGCAGGCAGCCA
CACAGTGCAGAGGATGTATGGCTGTGATGTTGGCAGCGACTGGAGGTTCTCTGAGAGGCT
ACCATCAGTATGCCTACGATGGCAAGGACTACATTGCTCTGAAGGAGGACTTGAGAAGC
TGGACAGCAGCTGACATGGCAGCACAGACCACCAAGCACAAAGTGGGAAGCTGCTCATG
TTGCTGAGCAACTGAGAGCCTATCTGGAAGGCACCTGTGTGGAGTGGTTGAGACGCTAT
CTGGAGAATGGCAAGGAGACCTTGCAGAGAACC GATTCCCCAAAGGCTCATGTGACCC
GTCACAGCAGACCTGAAGATAAAGTCACCCCTGAGGTGCTGGGCTCT CGGCTTCTACCCCT
GCTGACATCACCCCTGACCTGGCAGTTGATGGRRRRRRRRRSYWWA

а

TKCAGATGTTA GTGGGATCGAGACATGACGCGT GGTGGAGGTGGCAGTGGAGGTGGAG
GCTCTGGTGGTGGAGGATCT CACAGCATGAGGTACTTCTTCACCAGCGTGTCCAGACCT
GGCAGAGGTGAACCCAGGTTTCATTGCCGTTGGCTACGTGGACGACACCCAGTTCGTTTCG
CTTCGACAGCGATGCTGCAAGTCAGAGGATGGAACCGAGAGCACCCCTGGATCGAGCAG
GAAGGTCCTGAGTACTGGGATGGAGAGACCAGGAAGGTGAAAGCTCACAGTCAGACCC
ACAGAGTTGACCTTGGAACTGAGAGGCTACTACAACCAAGTCTGAGGCAGGCAGCCA
CACAGTGCAGAGGATGTATGGCTGTGATGTTGGCAGCGACTGGAGGTTCTCTGAGAGGCT
ACCATCAGTATGCCTACGATGGCAAGGACTACATTGCTCTGAAGGAGGACTTGAGAAGC
TGGACAGCAGCTGACATGGCAGCACAGACCACCAAGCACAAAGTGGGAAGCTGCTCATG
TTGCTGAGCAACTGAGAGCCTATCTGGAAGGCACCTGTGTGGAGTGGTTGAGACGCTAT
CTGGAGAATGGCAAGGAGACCTTGCAGAGAACC GATTCCCCAAAGGCTCATGTGACCC
GTCACAGCAGACCTGAAGATAAAGTCACCCCTGAGGTGCTGGGCTCT CGGCTTCTACCCCT
GCTGACATCACCCCTGACCTGGCAGTTGATGGRRRRRRRRRSYWWA

б

Рис. 3. Сиквенс с прямым праймером трансгена *HLA-A*02:01:01:01*: а — лимфоциты крови, б — селезёнка. Цветом обозначены функциональные части трансгена: **hb2mg** — фрагмент бета-2-микроглобулина человека, **Linker** — линкер, **0201** — *HLA-A*02:01:01:01*, **H2** — фрагмент H2 K мыши.

Примечание: обнаружена однонуклеотидная замена в области H2: триплет CTT (Leu) заменен на CTC (Leu) — без изменения аминокислотного состава конечного белка (выделена красным).

Fig. 3. Sequence with a forward primer of the *HLA-A*02:01:01:01* transgene: а — blood lymphocytes, б — spleen. The color indicates the functional parts of the transgene: **hb2mg** — fragment of human beta-2-microglobulin, **Linker** — linker, **0201** — *HLA-A*02:01:01:01*, **H2** — fragment of mouse H2 K.

Note: a single nucleotide substitution was detected in the H2 region: the triplet CTT (Leu) was replaced by CTC (Leu) — without changing the amino acid composition of the final protein (highlighted in red).

Сравнение полученных из образцов тканей нуклеотидных последовательностей показало не только 100% соответствие (рис. 5) первичной последовательности заявленной ГИК и гену *HLA-A*02:01:01:01* человека, но и отсутствие химеризма, что является важным показателем наследуемого признака. Таким образом, полученные животные несут полный и транскрипционно активный трансген *HLA-A*02:01:01:01*, целиком соответствующий заявленной



Рис. 4. Сиквенс с прямым праймером b2mgF ПЦР-ампликонов ДНК мышей, несущих ген *HLA-A*02:01:01:01*: а — лимфоциты крови, б — селезёнка.

Скриншоты окна программы Chromas: блоками выделены фрагменты фланкирующих *HLA-0201* последовательностей: сверху слева — линкер, внизу справа — H2-k.

Fig. 4. Sequence with forward primer PCR amplicons of b2mgF DNA from mice with *HLA A*02:01:01:01*: a — blood lymphocytes, b — spleen.

Screenshots of program Chromas: fragments of *HLA-0201* flanking sequences are highlighted in blocks: top left — linker, bottom right — H2-k.

генно-инженерной конструкции и гену *HLA-A*02:01:01:01* человека. Сравнение нуклеотидных последовательностей из разных органов расхождений в первичной структуре трансгена не выявило.

Селекционная работа с животными, несущими трансген *HLA-A*02:01:01:01*, в поколениях F1–F3

Трудоёмкость процесса получения новых линий трансгенных животных накладывает ответственность на сотрудников вивария. Грамотная селекционная работа с полученными родоначальниками новой линии позволяет за обозримый период времени получить достаточное количество животных, покрывающих как нужды

Query	1261	GCATTCACTTGTCTTTTCAGCAAGGACTGGTCTTTCTATCTCTTGTAACACTGAATT	1320
Query	1321	CACCCCCACTGAAAAAGATGAGTATGCCTGCCGTGTGAACCATGTGACTTTGTACAGCC	1380
Query	1381	CAAGATAGTTAAGTGGGATCGAGACATGACGCGTGGTGGAGGTGGCAGTGGAGGTGGAGG	1440
Sbjct	1	GTGGGATCGAGACATGACGCGTGGTGGAGGTGGCAGTGGAGGTGGAGG	48
Query	1441	CTCTGGTGGTGGAGGATCTCACAGCATGAGGTACTTCTTACCAGCGTGTCCAGACCTGG	1500
Sbjct	49	CTCTGGTGGTGGAGGATCTCACAGCATGAGGTACTTCTTACCAGCGTGTCCAGACCTGG	108
Query	1501	CAGAGGTGAACCCAGGTTTCATTGCCGTTGGCTACGTGGACGACACCCAGTTCGTTTCGCTT	1560
Sbjct	109	CAGAGGTGAACCCAGGTTTCATTGCCGTTGGCTACGTGGACGACACCCAGTTCGTTTCGCTT	168
Query	1561	CGACAGCGATGCTGCAAGTCAGAGGATGGAACCGAGAGCACCCTGGATCGAGCAGGAAGG	1620
Sbjct	169	CGACAGCGATGCTGCAAGTCAGAGGATGGAACCGAGAGCACCCTGGATCGAGCAGGAAGG	228
Query	1621	TCCTGAGTACTGGGATGGAGAGACCAGGAAGGTGAAAGCTCACAGTCAGACCCACAGAGT	1680
Sbjct	229	TCCTGAGTACTGGGATGGAGAGACCAGGAAGGTGAAAGCTCACAGTCAGACCCACAGAGT	288
Query	1681	TGACCTTGAACACTGAGAGGCTACTACAACCAGTCTGAGGCAGGCAGCCACACAGTGCA	1740
Sbjct	289	TGACCTTGAACACTGAGAGGCTACTACAACCAGTCTGAGGCAGGCAGCCACACAGTGCA	348
Query	1741	GAGGATGTATGGCTGTGATGTTGGCAGCGACTGGAGGTTCTGAGAGGCTACCATCAGTA	1800
Sbjct	349	GAGGATGTATGGCTGTGATGTTGGCAGCGACTGGAGGTTCTGAGAGGCTACCATCAGTA	408
Query	1801	TGCCTACGATGGCAAGGACTACATTGCTCTGAAGGAGGACTTGAGAAGCTGGACAGCAGC	1860
Sbjct	409	TGCCTACGATGGCAAGGACTACATTGCTCTGAAGGAGGACTTGAGAAGCTGGACAGCAGC	468
Query	1861	TGACATGGCAGCAGACACCACCAAGCACAAGTGGGAAGCTGCTCATGTTGCTGAGCAACT	1920
Sbjct	469	TGACATGGCAGCAGACACCACCAAGCACAAGTGGGAAGCTGCTCATGTTGCTGAGCAACT	528
Query	1921	GAGAGCCTATCTGGAAGGCACCTGTGTGGAGTGGTTGAGACGCTATCTGGAGAATGGCAA	1980
Sbjct	529	GAGAGCCTATCTGGAAGGCACCTGTGTGGAGTGGTTGAGACGCTATCTGGAGAATGGCAA	588
Query	1981	GGAGACCTTGAGAGAACCGATTCCCCAAAGGCTCATGTGACCCGTACAGCAGACCTGA	2040
Sbjct	589	GGAGACCTTGAGAGAACCGATTCCCCAAAGGCTCATGTGACCCGTACAGCAGACCTGA	648
Query	2041	AGATAAAGTCACCTGAGGTGCTGGGCTCTCGGCTTCTACCCTGCTGACATCACCTGAC	2100
Sbjct	649	AGATAAAGTCACCTGAGGTGCTGGGCTCTCGGCTTCTACCCTGCTGACATCACCTGAC	708
Query	2101	CTGGCAGTTGAATGGGAGGAGCTGACCCAGGACATGGAGCTTGTGGAGACCAGGCCTGC	2160
Sbjct	709	CTGGCAGTTGA	719
Query	2161	AGGAGATGGAACCTTCCAGAAGTGGGCATCTGTGGTCGTGCCTCTTGGGAAGGAGCAGTA	2220
Query	2221	CTACACATGCCATGTGTACCATCAGGGACTGCCTGAGCCTCTACCCTGAGATGGGAGCC	2280

Рис. 5. Сравнение нуклеотидной последовательности трансгена *hb2mg-Linker-0201-H2*, полученной из лимфоцитов крови, с соответствующей нуклеотидной последовательностью ГИК *CBH-b2m-A0201-H2K* (BLAST, Alien, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Get&RID=HWE90DX711N>).

Fig. 5. Comparison of the nucleotide sequence of the *hb2mg-Linker-0201-H2* transgene from blood lymphocytes with the corresponding nucleotide sequence of the *CBH-b2m-A0201-H2K* construct (BLAST, Alien, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Get&RID=HWE90DX711N>).

исследователей, так и ресурсный фонд племенных ядер для поддержания линии. Особую роль в процессе выведения новой линии играет внимательность при подборе пар, отбор наиболее перспективных племян и сублиний для размножения, а также обязательный генетический скрининг поголовья животных.

После микроинъекций ГИК в пронуклеусы зигот и трансплантации выживших эмбрионов псевдобеременным самкам-реципиентам нами была получена 91 живая особь, 18 из которых несли искомую модификацию генома. Соотношение полов среди трансгенных особей составило 1:1 (9 самцов и 9 самок). Для проведения селекционной работы и выведения новой линии были сформированы 18 сублиний. Самок и самцов поколения F0, несущих трансген *HLA-A*02:01:01:01*, скрещивали с противоположным полом с гибридными особями линии CBA/lac×C57Bl/6 (F1) в возрасте 2 мес. В результате скрещивания было получено 190 мышей (поколение F1), из которых 28 особей показали наличие гена *HLA-A*02:01:01:01*.

Для дальнейшей селекционно-генетической работы и получения поколений F2–F3 в племядра отбирали положительных по трансгену *HLA-A*02:01:01:01* особей предыдущего поколения по схеме инбредного скрещивания. В табл. 5 показана динамика передачи трансгена в поколениях F0–F3.

Из табл. 5 видно, как растёт процент трансгенных особей с увеличением поколения, что свидетельствует о стойком наследовании данного признака. По ходу селек-

ционно-генетической работы проводилась выбраковка сублиний и племян, имеющих низкий потенциал размножения и/или передачи признака. В качестве критериев для выбраковки нами были определены следующие: низкая сила экспрессии трансгена, невысокий показатель наследования трансгена, сниженные показатели фертильности и плодовитости (удлиненный репродуктивный цикл, небольшое количество детёнышей в помёте, каннибализм, неразвитый материнский инстинкт). Для выведения новой линии одновременно производится размножение животных трех поколений, не менее пяти племян в каждом, что соответствует стандартам разведения лабораторных мышей и позволяет безопасно наращивать поголовье животных без риска потерять линию. На сегодняшний день для активного размножения и выведения чистой линии выделены 3 сублинии, имеющие наилучшие показатели как по транскрипционной активности трансгена (силе экспрессии трансгена), так и по плодовитости и эффективности передачи признака в ряде поколений. Кроме того, генетический скрининг поголовья животных показал отсутствие химеризма при передаче искомого признака, а также наследование полной (т. е. с сохранением всех функциональных элементов, без потери каких-либо участков) генетической конструкции, что свидетельствует о стабильности передачи трансгена от поколения к поколению.

Заключение

Нами была проведена работа по созданию методики эффективной и высокоспе-

Таблица 5. Динамика передачи трансгена и наращивания поголовья в трансгенной линии мышей, несущих ген *HLA-A*02:01:01:01*

Table 5. Dynamics of transgene transmission and population growth in a transgenic line of mice with *HLA-A*02:01:01:01* gene

Поколение	F0	F1	F2	F3
Доля трансгенных особей в поколении, %	20	15	46	68
Всего особей в поколении	91	190	98	156
Всего трансгенных особей в поколении	18	28	45	106

цифичной системы детекции трансгена *HLA-A*02:01:01:01* у мышей новой гуманизированной трансгенной линии. Использование специально подобранных и адаптированных праймеров и метода ПЦР в реальном времени позволяет точно и относительно быстро определить наличие всех функционально значимых элементов ГИК в геноме мышей. Использование в РВ-ПЦР высокоспецифичных флуоресцентных зондов служит дополнительным контролем качества проведения исследования.

Далее методом секвенирования по Сэнгеру было показано полное соответствие первичной нуклеотидной последовательности трансгена *HLA-A*02:01:01:01* заявленной ГИК и гену человека. Кроме того, для генетических исследований нами была использована кДНК, что говорит о транскрипционной активности трансгена и служит косвенным подтверждением функциональной активности конечного продукта — химерной молекулы МНС класса I на поверхности клеток мышей новой линии.

В ходе селекционно-генетической работы с животными новой линии проводился строгий отбор особей и сублиний для размножения. Дополнительно проводили генетический анализ на наличие полной ГИК в геноме и отсутствие химеризма в органах и тканях. Животные, имеющие низкий репродуктивный потенциал, сниженные показатели экспрессии трансгена и/или нарушения в первичной структуре ГИК, из размножения исключались. На сегодня для выведения новой гуманизированной трансгенной линии мышей, несущих ген *HLA-A*02:01:01:01*, отобраны 3 сублинии, максимально соответствующие нашим критериям качества. В ряде поколений наблюдается постепенное увеличение доли особей, положительных по трансгену *HLA-A*02:01:01:01*, что свидетельствует

об успешной реализации стратегии размножения и стойком полном наследовании искомого признака.

Созданная на базе НЦБМТ ФМБА новая гуманизированная трансгенная линия мышей, несущих ген *HLA-A*02:01:01:01*, отражает популяционные особенности иммунного ответа, характерные для населения России. Однако анализ распределения аллелей главного комплекса гистосовместимости среди мировых популяций [7, 21] свидетельствует о наличии данной аллели в иных мировых сообществах, преимущественно, у европеоидов, что говорит об универсальности применения созданной биомодели для различных исследований в области медицины и фармакологии [8, 11, 20, 21]. Огромный опыт по биомоделированию социальнозначимых заболеваний [5] и созданию и верификации [1–4] гуманизированных трансгенных моделей позволяет НЦБМТ ФМБА России создавать уникальные биомодели, соответствующие современным стандартам качества. Успешное применение актуальных методов и подходов к биомоделированию позволяет в кратчайшие сроки реализовывать поставленные задачи. Контроль и совершенствование внутренних протоколов работы позволяют сохранять высокий уровень проведения научных исследований и строгое следование принципам 3R [18].

Таким образом, в настоящее время продолжается активная селекционно-генетическая работа по выведению новой линии гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген *HLA-A*02:01:01:01*. Полученные животные могут быть использованы для различных исследований, включая исследования иммунных реакций, инфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваний, а также разработки и тестирования вакцин и исследования в области фармакобезопасности и иммуногенности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Каркищенко В.Н., Болотских Л.А., Капанадзе Г.Д., Каркищенко Н.Н., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Матвеев Е.Л., Петрова Н.В., Рябых В.П., Ревякин А.О., Станкова Н.В., Семёнов Х.Х. Создание линий трансгенных животных-моделей с генами человека NAT1 и NAT2. *Биомедицина*. 2016;1:74–84. [Karkischenko V.N., Bolotskih L.A., Kapanadze G.D., Karkischenko N.N., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Matveyenko E.L., Petrova N.V., Ryabyh V.P., Revyakin A.O., Stankova N.V., Semenov H.H. Sozdanie liniy transgennykh zhivotnykh-modelej s genami cheloveka NAT1 i NAT2 [Creation of lines of transgenic animal models with human NAT1 and NAT2 genes]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2016;1:74–84. (In Russian)].
2. Каркищенко В.Н., Рябых В.П., Болотских Л.А., Семенов Х.Х., Капанадзе Г.Д., Петрова Н.В., Езерский В.А., Жукова О.Б., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Столярова В.Н., Трубицина Т.П. Физиолого-эмбриологические аспекты создания трансгенных мышей с интегрированными генами NAT1 и NAT2 человека. *Биомедицина*. 2016;1:52–65. [Karkischenko V.N., Ryabyh V.P., Bolotskih L.A., Semenov H.H., Kapanadze G.D., Petrova N.V., Ezerskiy V.A., Zhukova O.B., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Stolyarova V.N., Trubicina T.P. Fiziologo-embriologicheskie aspekty sozdaniya transgennykh myshej s integrirovannymi genami NAT1 i NAT2 cheloveka [Physiological and Embryological Aspects of Creation of Transgenic Mice with Integrated Human NAT1 and NAT2 Genes]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2016;1:52–65. (In Russian)].
3. Каркищенко В.Н., Рябых В.П., Каркищенко Н.Н., Дуля М.С., Езерский В.А., Колоскова Е.М., Лазарев В.Н., Максименко С.В., Петрова Н.В., Столярова В.Н., Трубицина Т.П. Молекулярно-генетические аспекты технологии получения трансгенных мышей с интегрированными генами N-ацетилтрансферазы (NAT1 и NAT2) человека. *Биомедицина*. 2016;1:4–17. [Karkischenko V.N., Ryabyh V.P., Karkischenko N.N., Dulya M.S., Ezerskiy V.A., Koloskova E.M., Lazarev V.N., Maksimenko S.V., Petrova N.V., Stolyarova V.N., Trubicina T.P. Molekulyarno-geneticheskie aspekty tekhnologii polucheniya transgennykh myshej s integrirovannymi genami N-acetiltransferazy (NAT1 i NAT2) cheloveka [Molecular genetic aspects of the technology for obtaining transgenic mice with integrated human N-acetyltransferase (NAT1 and NAT2) genes]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2016;1:4–17. (In Russian)].
4. Каркищенко Н.Н., Петрова Н.В., Слободенюк В.В. Высокоспецифичные видовые праймеры к генам Nat1 и Nat2 для сравнительных исследований у человека и лабораторных животных. *Биомедицина*. 2014;1(2):4–24. [Karkischenko N.N., Petrova N.V., Slobodenyuk V.V. Vysokospecifichnye vidovye primery k genam Nat1 i Nat2 dlya sravnitel'nykh issledovaniy u cheloveka i laboratornykh zhivotnykh [Highly specific species primers for the Nat1 and Nat2 genes for comparative studies in humans and laboratory animals]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2014;1(2):4–24. (In Russian)].
5. Помыткин И.А., Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Нестеров М.С., Петрова Н.В. Модель фатального острого поражения легких и острого респираторного дистресс-синдрома. *Биомедицина*. 2020;16(4):24–33. [Pomytkin I.A., Karkischenko V.N., Fokin Yu.V., Nesterov M.S., Petrova N.V. Model' fatal'nogo ostrogo porazheniya legkikh i ostrogo respiratornogo distress-sindroma [A Model of Fatal Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2020;16(4):24–33. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2713-0428-16-4-24-33.
6. Савченко Е.С., Огнева Н.С., Каркищенко Н.Н. Эмбриологические аспекты создания новой гуманизированной трансгенной линии мышей с интегрированным геном человека *HLA-A*02:01:01:01*. *Биомедицина*. 2022;18(4):10–23. [Savchenko E.S., Ogneva N.S., Karkischenko N.N. Embriologicheskie aspekty sozdaniya novoy humanizirovannoy transgennoj linii myshej s integrirovannym genom cheloveka *HLA-A*02:01:01:01* [Embryological Aspects of Creation a New Humanized Transgenic Mice with Integrated human *HLA-A*02:01:01:01* gene]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2022;18(4):10–23. (In Russian)].
7. Aigner B., et al. Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *Journal of molecular medicine*. 2010;88:653–664.
8. Bai J., Wang J., Yang Y., Wang F., He A., Zhang W. Identification of HLA-A*0201-restricted CTL Epitopes for MLLA-34-specific Immunotherapy for Acute Monocytic Leukemia. *J. Immunother*. 2021;44(4):141–150.
9. Beckford-Vera D.R., Gonzalez-Junca A., Janneck J.S., Huynh T.L., Blecha J.E., Seo Y., Li X., VanBrocklin H.F., Franc B.L. PET/CT Imaging of Human TNF α Using [89Zr] Certolizumab Pegol in a Transgenic Preclinical Model of Rheumatoid Arthritis. *Mol. Imaging Biol*. 2020;22(1):105–114.
10. Carter D.B., et al. Phenotyping of transgenic cloned piglets. *Cloning and stem cells*. 2002;4:131–145.
11. Chen Z., Ruan P., Wang L., Nie X., Ma X., Tan Y. T and B cell Epitope analysis of SARS-CoV-2 S protein based on immunoinformatics and experimental research. *J. Cell Mol. Med*. 2021.
12. Chu M.L., Moran E. The Limb-Girdle Muscular Dystrophies: Is Treatment on the Horizon? *Neurotherapeutics*. 2018;15(4):849–862.
13. Giraldo P., Rival-Gervier S., Houdebine L.M., Montoliu L. The potential benefits of insulators on heterologous constructs in transgenic animals. *Transgenic Res*. 2003;12:751–755.

14. Levedakou E.N., Popko B. Rewiring enervated: thinking LARGER than myodystrophy. *J. Neurosci. Res.* 2006;84(2):237–243.
15. Ma L., Wang Y., Wang H., Hu Y., Chen J., Tan T., Hu M., Liu X., Zhang R., Xing Y., Zhao Y., Hu X., Li N. Screen and Verification for Transgene Integration Sites in Pigs. *Sci. Rep.* 2018;8(1):7433.
16. Paquet D., Kwart D., Chen A., et al. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature.* 2016;533:125–129.
17. Rogers C.S., et al. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science.* 2008;321:1837–1841.
18. Russell W.M.S. BRL. The Principles of Humane Experimental Technique. *Med. J. Aust. [Internet].* 1960;1(13):500.
19. Schroder A.R.W., et al. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell.* 2002;110:521–529.
20. Thomas R., Shaath H., Naik A., Toor S.M., Elkord E., Decock J. Identification of two HLA-A*0201 immunogenic epitopes of lactate dehydrogenase C (LDHC): potential novel targets for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 2020;69(3):449–463.
21. Valkenburg S.A., Josephs T.M., Clemens E.B., Grant E.J., Nguyen T.H., Wang G.C., Price D.A., Miller A., Tong S.Y., Thomas P.G., Doherty P.C., Rossjohn J., Gras S., Kedzierska K. Molecular basis for universal HLA-A*0201-restricted CD8⁺ T-cell immunity against influenza viruses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2016;113(16):4440–4445.
22. van Vuuren A.J., van Roon J.A., Walraven V., Stuij I., Harmsen M.C., McLaughlin P.M., van de Winkel J.G., Thepen T. CD64-directed immunotoxin inhibits arthritis in a novel CD64 transgenic rat model. *J. Immunol.* 2006;176(10):5833–5838.
23. Yang D.S., et al. Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs. *Hum. Mol. Genet.* 2010;19:3983–3994.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Каркищенко Николай Николаевич, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, акад. РАРАН и Международной академии астронавтики (Париж), ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: niknik2808@yandex.ru

Глотова Елена Сергеевна*, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: savelaine@gmail.com

Петрова Наталья Владимировна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: m-sklad@yandex.ru

Слободенюк Владимир Владимирович, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: prof-v-iprim@mail.ru

Ларюшина Надежда Андреевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: kichi09@mail.ru

Nikolay N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Corr. Member of the RAS, Acad. of the Russian Academy of Rocket and Artillery Sciences, Acad. of the International Academy of Astronautics (Paris), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: niknik2808@yandex.ru

Elena S. Glotova*, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: savelaine@gmail.com

Nataliya V. Petrova, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: m-sklad@yandex.ru

Vladimir V. Slobodenyuk, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: prof-v-iprim@mail.ru

Nadezhda A. Laryushina, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: kichi09@mail.ru

Петров Дмитрий Валерьевич, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;
e-mail: 1941-65@mail.ru

Dmitry V. Petrov, Scientific Center of Biomedical
Technologies of the Federal Medical and Biological
Agency of Russia;
e-mail: 1941-65@mail.ru

Васильева Ирина Андреевна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;
e-mail: rozhtul@mail.ru

Irina A. Vasil'eva, Scientific Center of Biomedical
Technologies of the Federal Medical and Biological
Agency of Russia;
e-mail: rozhtul@mail.ru

Дерябин Кирилл Егорович, ФГБУН «Науч-
ный центр биомедицинских технологий ФМБА
России»;
e-mail: sairuswargeartwoguns@gmail.com

Kirill E. Deryabin, Scientific Center of Biomedical
Technologies of the Federal Medical and Biological
Agency of Russia;
e-mail: sairuswargeartwoguns@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author