

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО ПРОДУКТА НА ОСНОВЕ ХОНДРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ МЫШАМ ЛИНИИ BALB/C NUDE

П.А. Голубинская^{1,*}, А.С. Пикина¹, Е.С. Ручко¹, Е.В. Коженевская², А.Д. Поспелов²,
А.А. Бабаев², В.А. Иванов¹, Ю.А. Беспярых¹, Л.С. Шнайдер³, А.В. Еремеев¹

¹ ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
им. Ю.М. Лопухина ФМБА России»
119435, Российская Федерация, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а

² ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»
603022, Российская Федерация, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23

³ ГБУЗ «Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова» ДЗМ
111123, Российская Федерация, Москва, ул. Новогиреевская, 1, корп. 1

Целью данной работы было исследовать биораспределение разработанного нами продукта тканевой инженерии (ПТИ) на основе хондроцитов различного генеза в виде 3D-структур (хондросфер) после подкожной имплантации иммунодефицитным мышам линии Balb/c Nude. В начале имплантировали хондросферы на основе хондроцитов человека, хондроцитов из дифференцированных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), в т. ч. линии с нокаутом гена $\beta 2m$. В течение 9 мес. проводили наблюдение за животными. Далее от мышей после эвтаназии получали образцы органов и тканей для гистологического анализа, оценки состоятельности имплантата, его интеграции и исследования биораспределения методом ПЦР. Хондросферы из дифференцированных производных ИПСК успешно интегрировались в окружающие ткани в зоны инокуляции, формировали хрящевую ткань. В образцах около имплантационной зоны опытных групп животных не было выявлено человеческой ДНК, которую обнаруживали в образцах органов контрольных групп (введение MDA231 и мезенхимальных стволовых клеток). Таким образом, исследуемые образцы ПТИ через 3 и 9 мес. после имплантации демонстрировали отсутствие биораспределения в другие ткани и органы мышей, что свидетельствует в пользу безопасности разрабатываемого препарата.

Ключевые слова: препарат тканевой инженерии, хондроциты, биораспределение, доклинические исследования, хондросферы, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: научное исследование проведено в рамках гранта РНФ № 22-15-00250.

Благодарности: авторы выражают свою признательность научным сотрудникам лаборатории клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России за методологическую поддержку в процессе исследования.

Для цитирования: Голубинская П.А., Пикина А.С., Ручко Е.С., Коженевская Е.В., Поспелов А.Д., Бабаев А.А., Иванов В.А., Беспярых Ю.А., Шнайдер Л.С., Еремеев А.В. Исследование биораспределения тканеинженерного продукта на основе хондроцитов человека различного происхождения при имплантации мышам линии Balb/c Nude. *Биомедицина*. 2024;20(3E):160–175. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-160-175>

Поступила 23.08.2024

Принята после доработки 30.09.2024

Опубликована 01.11.2024

STUDY OF THE BIODISTRIBUTION OF A TISSUE-ENGINEERED PRODUCT BASED ON HUMAN CHONDROCYTES OF VARIOUS SOURCES AFTER IMPLANTATION INTO BALB/C NUDE MICE

Polina A. Golubinskaya^{1*}, Arina S. Pikina¹, Eugene S. Ruchko¹,
Evgeniya V. Kozhenevskaya², Anton Dz. Pospelov², Aleksey A. Babaev², Viktor A. Ivanov¹,
Julia A. Bespyatykh¹, Lev S. Shnyder³, Artem V. Ereemeev¹

¹ Federal Scientific and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine
named after Yu.M. Lopukhin of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
119435, Russian Federation, Moscow, Malaya Pirogovskaya Str., 1a

² Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod
603022, Russian Federation, Nizhny Novgorod, Gagarina Ave., 23

³ Moscow Clinical Scientific Center named after A.S. Loginov of the Moscow Health Care Department
111123, Russian Federation, Moscow, Novogireyevskaya Str., 1, Building 1

In this research, we develop a tissue-engineered product (TEP) based on chondrocytes of various genesis in the form of 3D structures (chondrospheres) after subcutaneous implantation in immunodeficient Balb/c Nude mice and investigate its biodistribution profile. Initially, chondrospheres based on chondrocytes and chondrocytes from differentiated induced pluripotent stem cells (iPSCs), including lines with a knockout of the $\beta 2m$ gene, were implanted. The animals were monitored for nine months. Further, after euthanasia, organ and tissue samples were obtained for histological analysis, evaluation of the viability of the implant, its integration and biodistribution research by PCR. Chondrospheres from differentiated iPSCs derivatives of both types successfully integrated into the surrounding tissues in the inoculation zones and formed cartilage tissue. In the samples near the implantation zone of the experimental groups of animals, no human DNA was detected. Human DNA was found in the samples of organs of the control groups (introduction of MDA231 and mesenchymal stem cells). Thus, three and nine months after implantation, the studied TEP samples demonstrated the absence of biodistribution to other tissues and organs of mice, which indicates the safety of the drug being developed.

Keywords: tissue engineering, chondrocytes, biodistribution, preclinical studies, chondrospheres, induced pluripotent stem cells

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

Funding: this work was financially supported by Russian Science Foundation (Grant No. 22-15-00250).

Acknowledgements: the authors express their gratitude to the scientific staff of the Laboratory of Cell Biology of the Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of the Federal Medical and Biological Agency of Russia for methodological support in the research process.

For citation: Golubinskaya P.A., Pikina A.S., Ruchko E.S., Kozhenevskaya E.V., Pospelov A.Dz., Babaev A.A., Ivanov V.A., Bespyatykh Ju.A., Shnyder Le.S., Ereemeev A.V. Study of the Biodistribution of a Tissue-Engineered Product Based on Human Chondrocytes of Various Sources After Implantation into Balb/c Nude Mice. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):160–175. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-160-175>

Submitted 23.08.2024

Revised 30.09.2024

Published 01.11.2024

Введение

Воспалительные заболевания суставов, особенно после травм у лиц, связанных с экстремальной деятельностью, широко распространены во всём мире и характе-

ризуются последующими хроническими дегенеративными изменениями хрящевой ткани. Отсутствие сосудистой сети в суставе, низкая пролиферативная активность зрелых хондроцитов и большое ко-

личество внеклеточного матрикса (ВКМ) в сочетании с воспалительным процессом в ткани препятствуют естественной регенерации суставного хряща; в результате заболевание прогрессирует до полной дегенерации суставного аппарата, затрагивая поверхностные слои костной и хрящевой ткани [12], что приводит к инвалидизации. Использование продуктов тканевой инженерии (ПТИ) считается оправданным у пациентов на I–II стадиях патологического процесса [15]. При более глубоких деформациях необходимо выполнение корригирующей остеотомии, а в тяжёлых случаях показано эндопротезирование [20].

Аутологичные хондроциты являются клиническим подходом, который доказал свою эффективность. Одним из используемых за рубежом клеточных препаратов для терапии дефектов суставного хряща человека является Spherox™ («Co.don», Германия), который представляет собой тканеинженерную 3D-конструкцию из аутологичных клеток пациента. На данный момент компания ОА «Генериум» по лицензии «Co. don» производит данный препарат в РФ [1]. Учитывая положительные результаты исследований в области клеточной терапии, развитие и внедрение подобных технологий в исследовательскую и медицинскую практику в РФ является востребованным.

Несмотря на то, что продукты клеточных технологий на основе аутологичных хондроцитов для восстановления хряща уже присутствуют на медицинском рынке, они направлены преимущественно на коррекцию незначительных повреждений суставного хряща и не покрывают потребности пациентов с тяжёлыми или обширными поражениями [7]. В частности, при появлении остеофитов применение клеточных технологий может быть ограничено, а в случае длительного применения глюкокортикоидов, лучевой и химиотерапии, когда утрачивается хондрогенный потенциал хрящевой ткани, — невозможно получить

достаточное количество аутологичных хондроцитов для создания полноценного хрящевого имплантата, для которого требуется большое количество дифференцированных клеток [13]. Возраст донора также влияет на потенциал дифференцировки, иммуномодулирующие свойства и миграционные способности клеток, что ограничивает их использование для некоторых пациентов. Применение хондроцитов также ограничено нестабильностью фенотипа и спонтанной дедифференцировкой, происходящей во время культивирования [18]. В связи с этим индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) являются перспективным источником хондрогенно-дифференцированных клеток [9]. В отличие от аутологичных хондроцитов и мезенхимальных стволовых клеток (МСК), ИПСК демонстрируют неограниченный рост *in vitro* и широкий спектр возможностей к дифференцировке, аналогичный эмбриональным стволовым клеткам (ЭСК), но без этических проблем [23]. На сегодняшний день есть сообщения об успешных трансплантациях аутологичных клеток, дифференцированных из ИПСК [16]. Однако получение ИПСК с последующей дифференцировкой и созданием трансплантата — это весьма длительный и дорогостоящий процесс, который нуждается в оптимизации и стандартизации. В литературе есть данные об успешном приживлении в суставном хряще обезьян ИПСК, дифференцированных в хондрогенном направлении. В данном исследовании размеры дефекта хрящевой ткани были небольшими, поэтому необходимы дальнейшие исследования на других моделях. Что касается исследования иммуногенности, трансплантат при подсадке в хрящевые дефекты через четыре недели не вызывал иммунной реакции у макаков, в то время как в костно-хрящевых дефектах трансплантат, хотя и оставался интактным, был окружён большим скоплением

Т-лимфоцитов [3]. Перспективным подходом представляется создание и применение хрящевых трансплантатов на основе аллогенных дифференцированных в хондроциты ИПСК с пониженной иммуногенностью, универсальных для всех реципиентов [1]. Тем не менее, для хондроцитарных производных человека такие данные еще предстоит получить в будущем.

Большей перспективностью для терапии дефектов суставного хряща обладают трёхмерные структуры в виде сфероидов, образованные в результате самоагрегации клеток в специальных 3D-условиях культивирования [21]. Использование такой технологии благоприятно сказывается на пролиферативной активности и фенотипической стабильности зрелых хондроцитов [11]. В отличие от суспензии аутологичных хондроцитов, которые становятся способными к выработке внеклеточного матрикса (ВКМ) только через определённое время после имплантации, клетки в составе сфероидов способны к секреции компонентов ВКМ уже в условиях *in vitro* [22]. Кроме того, сфероиды не требуют использования ксеногенных или искусственных материалов и легко интегрируются в окружающие ткани в зоне имплантации [21]. В совокупности перечисленные свойства сфероидных ПТИ способствуют качественному заполнению дефекта хрящевой ткани. Ранее эффективность подобного подхода была продемонстрирована на животных моделях с использованием сфероидов, полученных из первичных культур хондроцитов человека, в клинических исследованиях [10], что доказывает значительно больший терапевтический эффект с точки зрения структурного восстановления дефекта хряща по сравнению с классической хирургической процедурой микроповреждений [22].

Целью настоящего исследования было изучение биораспределения сфероидного ПТИ «Хондросферы», разработанно-

го нами для последующей терапии повреждений суставного хряща у человека, через 9 мес. после подкожной имплантации иммунодефицитным мышам линии Balb/c Nude.

Материалы и методы

Нормативное регулирование

Данная работа представляла собой исследование нового ПТИ и проводилась согласно требованиям действующих нормативных регуляторов [19]. Исследование осуществляли согласно заранее утверждённому плану и в соответствии со стандартными операционными процедурами. Весь персонал вивария, проводивший работы по данному проекту, был обучен гуманному обращению с лабораторными животными в соответствии с Директивой Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22.09.2010 г. «О защите животных, использующихся для научных целей».

Лабораторные животные

Исследование проводилось в виварии Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и было одобрено Комиссией по биоэтике. В проведённом исследовании безопасности была выбрана инбредная линия мышей Balb/c Nude с иммунодефицитом. Животные были получены из питомника Charles River Laboratories («CRL», США) в 2017 г. На момент начала исследования возраст животных составлял 2 мес., средняя масса — $18,8 \pm 2,17$ г. Мышей содержали в IVC клетках GM500 Tecniplast, подключённых к системе ICV Smartflow Tecniplast, по 1–4 мыши на клетку с учётом пола животных. Смена клеток осуществлялась в ламинарном шкафу CS5 EVO. Комбикорм для лабораторных крыс и мышей «Дельта Фидс» (АО «БиоПро», Россия) и подстил для разведения и содержания лабораторных животных (ИП Филонич А.А., Россия) подвергались автоклавированию перед использованием. Вода, очищенная с помощью системы очистки воды RiOs 50

(«Merk Millipore», США) (50 л/ч), подавалась в автоклавированных питьевых бутылочках. Доступ к воде и корму — *ad libitum*. В комнате содержания SPF-животных барьерного типа поддерживались следующие условия окружающей среды: температура воздуха — $22 \pm 2^\circ\text{C}$; относительная влажность — $50 \pm 20\%$; автоматическая смена 12-часового светового периода (08.00–20.00 — день, 20.00–08.00 — ночь); 100%-ное вентилирование без рециркуляции с 10-кратной сменой объема воздуха в час.

Исследуемый препарат

и контрольные линии клеток

Исследуемые ПТИ представляли собой 3D-культуру сфероидов на основе хондроцитов человека или ИПСК, дифференцированных в хондрогенном направлении, и были получены, как описано ранее [2, 8]. Клетки линии RG4SΔb2m c155 представляли собой линию без генетических модификаций (ИПСК P1), вторая линия ИПСК RG4SΔb2m c155/1 являлась нокаутной по гену $\beta 2m$ (ИПСК P2). Получение, культивирование и исследование данной линии клеток описано в работах [5, 6]. Культивирование ИПСК проводилось на пластике, предварительно обработанном р-ром Matrigel («Corning», США), на смеси питательных сред «ГибриС-8» («ПанЭко», Россия) и mTeSR™ («STEMCELL Technologies», Канада) в соотношении 4:1. Обе линии ИПСК были дифференцированы в хондроциты с помощью протокола, который представляет собой комбинацию подходов, описанных в работах [14, 24]. В качестве питательной среды для хондроцитов использовали Advanced DMEM (Gibco, «Thermo Fisher Scientific», США) с добавлением 10% FBS («PAN Biotech», Германия), 100x GlutaMAX (Gibco, «Thermo Fisher Scientific», США), 50x B27 (Gibco, «Thermo Fisher Scientific», США), 1% инсулин-трансферрин-селенита (ИТС) («ПанЭко», Россия), 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты («Sigma

Aldrich», США), 50 мкМ β -меркаптоэтанола, 50 мкг/мл 100x-р-ра пенициллина/стрептомицина («ПанЭко», Россия). Культивирование сфероидов проводили в течение 28 сут, смену среды осуществляли каждые 3–4 сут. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) были получены путём ферментативной обработки жировой ткани от здоровых доноров. Линия клеток рака молочной железы MDA 231 была получена из биобанка лаборатории клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России и не подвергалась никаким дополнительным манипуляциям кроме культивирования *in vitro* для наращивания необходимого количества материала. Клетки линии MDA 231 и линию МСК культивировали в среде Advanced DMEM (Gibco, «Thermo Fisher Scientific», США) с добавлением 10% FBS («PAN Biotech», Германия) и 50 мкг/мл 100x-р-ра пенициллина/стрептомицина («ПанЭко», Россия) в стандартных условиях при 37°C и 5% CO_2 .

Дизайн эксперимента

ПТИ на основе хондроцитов человека вводили животным ($n=24$; 12 самок + 12 самцов) подкожно однократно в область головы между ушей в одной дозе в виде пяти сфероидов в физ. р-ре (группа 1). ПТИ из ИПСК, дифференцированных в хондрогенном направлении, имплантировали животным в той же дозе подкожно (группы 3–4, $n=16$, самцы). В группе плацебо-контроля было 24 мыши (12 самцов + 12 самок), которым подкожно в голову вводили 50 мкл физ. р-ра (группа 2). Мышам в группах положительного контроля подкожно закалывали линию МСК в дозе 250 тыс. клеток в 50 мкл Matrigel® («Corning», США) (группа 5, $n=2$, самцы) или линию клеток рака молочной железы MDA 231 в количестве 500 тыс. клеток в 50 мкл в 50 мкл Matrigel® (группа 6, $n=4$, самцы).

В течение всего эксперимента регулярно проводили взвешивание животных, наблюдение за их поведением, измеряли размер

инокулята в зоне имплантации электронным штангенциркулем и производили фотофиксацию внешнего вида подопытных животных. Через 3 мес. после начала эксперимента 50% самцов и самок групп 1 и 2, 50% самцов групп 3 и 4, а также все животные групп 5 и 6 были подвергнуты эвтаназии. После этого из животных были извлечены образцы следующих органов и тканей: лимфатические узлы, щитовидная железа, аорта, сердце, лёгкие, тимус, пищевод, желудок, поджелудочная железа, тонкий кишечник, толстый кишечник, печень, селезёнка, почки, мочевой пузырь, надпочечники, головной мозг, семенники, яичники, место введения, кровь. Умерщвлённых животных обрабатывали 96%-ным этанолом, последующие этапы изъятия образцов органов и тканей проводили в асептических условиях ламинарного бокса II класса защиты. Анализ биораспределения через 3 мес. после введения ПТИ показал отсутствие миграции в отдалённые органы и ткани, при этом человеческая ДНК детектировалась только в месте введения. Аналогичные манипуляции были проведены с оставшимися животными через 9 мес. после введения.

Гистологический анализ

Препараты готовили, как описано ранее [2]. Срезы окрашивали гематоксилином-

эозином и альциановым синим («Био Витрум», Россия).

Выделение нуклеиновых кислот и постановка ПЦР

Выделение геномной ДНК из органов мышей и капиллярной крови здорового донора, которую использовали в качестве положительного контроля человеческой ДНК, проводили, как описано ранее [2].

РНК выделяли с помощью регента ExtractRNA («Евроген», Россия). Обратную транскрипцию ставили с помощью набора MMLV RT («Евроген», Россия). ПЦР проводили с использованием готовой смеси для ПЦР 5X Screen Mix («Евроген», Россия) согласно инструкции производителя. В реакции для доказательства экспрессии хондроцитарных генов в культуре ИПСК-производных использовали праймеры, специфичные к генам *ACAN*, *ColIA2*, *ColIIA1*, *SOX9*. В качестве референсного гена применялся ген домашнего хозяйства *YWHAZ* (табл. 1).

Реакцию проводили при использовании термоциклера для амплификации нуклеиновых кислот 1000 CFX Manager («BioRad», США) и программного обеспечения CFX Manager. Количество циклов — 39. Анализ результатов проводили в программе Microsoft Excel по методу $\Delta\Delta Ct$.

В реакции по оценке биораспределения использовали праймеры, специфичные

Таблица 1. Последовательности праймеров, используемых для оценки хондрогенной дифференцировки
Table 1. Sequences of primers used to assess chondrogenic differentiation

Название праймера	Последовательность 5'→3'	Длина продукта, п.о.
ACAN-F	AGGAGTCCCTGACCTGGTTT	167
ACAN-R	CCTGACAGATCTGCCTCTCC	
ColIA2-F	AGGGTGAGACAGGCGAACA	184
ColIA2-R	CCGTTGAGTCCATCTTTGC	
ColIIA1-F	TGGACGCCATGAAGGTTTTCT	142
ColIIA1-R	CCATTGATGGTTTCTCCAAACC	
SOX9-F	GAAGTCGGTGAAGAACGGGC	283
SOX9-R	CACGTCGCGGAAGTCGATAG	
YWHAZ-F	ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA	94
YWHAZ-R	CCGCCAGGACAAACCAAGTAT	

Таблица 2. Последовательности праймеров, используемых для оценки биораспределения
Table 2. Sequences of primers used for biodistribution assessment

Название праймера	Последовательность 5'→3'	Длина продукта, п.о.
mActb-F	GAT GCA CAG TAG GTC TAA GTG GAG	121
mActb-R	CAC TCA GGG CAG GTG AAA CT	
COI-F	CAA CCT CAA CAC CAC CTT C	269

к генам цитохром-С-оксидазы 1 (*COI*) для обнаружения ДНК человека и β -актина, специфичного для мыши (*mActb*) для определения мышинной ДНК (табл. 2). Детекцию результатов ПЦР проводили с помощью электрофореза. Электрофорез ДНК проводили, как описано в работе [2].

Статистический анализ

Полученные результаты измерения массы испытуемых животных обрабатывали с помощью пакета программ SPSS Statistics 17.0 («IBM», США). Для проверки нормальности распределения признака применяли тест Шапиро — Уилка. В качестве метода сравнения использован *U*-тест Манна — Уитни (Mann — Whitney *U*-test). При множественных сравнениях применяли поправку Бонферрони. Различия между группами считали статистически досто-

верными при уровне значимости $p < 0,05$. Для построения графиков использовали программное обеспечение GraphPad Prism 9.5.1 («Dotmatics», США).

Результаты исследований

Контроль качества дифференцировки ИПСК

В качестве контроля проводимой дифференцировки ИПСК в хондрогенном направлении использовался метод ПЦР в реальном времени. Для используемых культур клеток подтвердили наличие экспрессии генов, характерных для хондроцитов человека (рис. 1).

Морфометрический анализ

При регулярном взвешивании животных в течение 9 мес. (рис. 2) статистически значимых различий по весу не выяв-

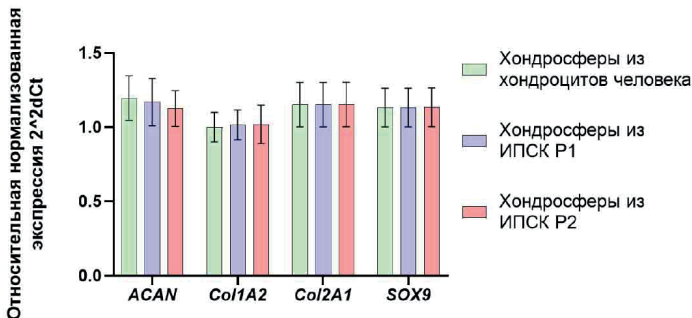


Рис. 1. Экспрессия хондрогенных маркеров клетками, используемыми для изготовления Хондросфер. Исследовалась экспрессия генов: *ACAN* — агрекан; *Col1A2* — коллаген 1-го типа; *Col2A1* — коллаген 2-го типа; *SOX9* — sex-determining region Y (*SRY*)-box 9. ИПСК P2 — Хондросферы на основе ИПСК с нокаутом $\beta 2m$, дифференцированных в хондрогенном направлении; ИПСК P1 — Хондросферы на основе ИПСК, дифференцированных в хондрогенном направлении.

Fig. 1. Expression of chondrogenic markers by cells used for the manufacture of Chondrospheres. Gene expression was studied: *ACAN* — aggrecan; *Col1A2* — type 1 collagen; *Col2A1* — type 2 collagen; *SOX9* — sex-determining region Y (*SRY*)-box 9. iPSC P2 — Chondrospheres based on iPSCs with $\beta 2m$ knockout, differentiated in the chondrogenic direction; iPSC P1 — Chondrospheres based on iPSCs, differentiated in the chondrogenic direction.

лено при сравнении контрольной группы с опытными.

Общеклиническое состояние животных опытных и контрольных групп не отличалось. Животные сохраняли активность и нормальное пищевое поведение. По результатам измерений размеров инокулята с течением времени были выявлены статистически значимые различия в размере новообразований между группой закола Хондросфер из хондроцитов человека и группой введения Хондросфер из ИПСК-производных (рис. 3).

Динамика изменений размера новообразований в положительных контрольных группах представлена на рис. 4.

Динамика размеров инокулята в опытной группе закола хондросфер из человеческих хондроцитов на поздних сроках исследования представлена на рис. 5.

Гистологический анализ

В результате гистологического исследования образцов ткани из зоны имплантации ПТИ наблюдали наличие стабильной хрящевой ткани с большим количеством хондроцитов и лакун, характерных для данного вида соединительной ткани (табл. 3). Миграция клеток из зоны имплантации была минимальной, без инвазивных черт. В группе положительного контроля после введения клеток линии аденокарциномы молочной железы MDA231 на гистологиче-

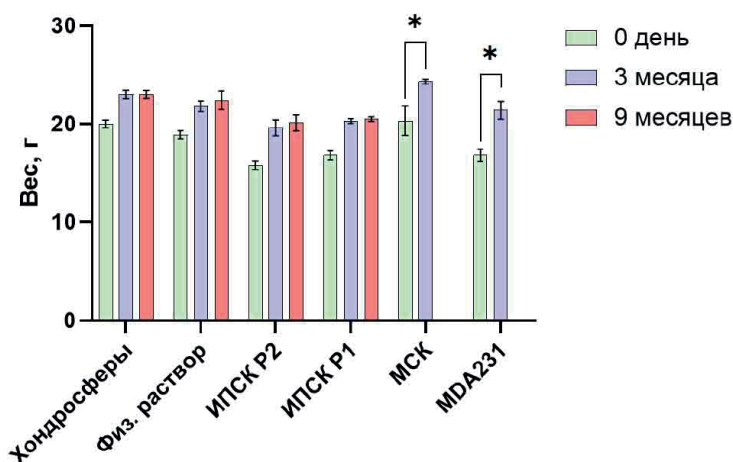


Рис. 2. Изменение массы тела экспериментальных животных по группам в ходе эксперимента на ранних этапах исследования (3 мес.) и на поздних сроках (9 мес.). По оси абсцисс обозначены сутки после введения, по оси ординат — вес, г. Хондросферы — группа самцов и самок, которым имплантировали ПТИ на основе хондроцитов человека, $n=24$; Физ. раствор — группа самцов и самок, которым подкожно вводили физ. р-р, $n=24$; ИПСК P2 — группа самцов, которым имплантировали ПТИ на основе ИПСК с нокаутом гена $\beta 2m$, дифференцированных в хондрогенном направлении, $n=8$; ИПСК P1 — группа самцов, которым имплантировали ПТИ на основе ИПСК, дифференцированных в хондрогенном направлении, $n=8$; МСК — группа самцов, которым имплантировали МСК, $n=2$; MDA231 — группа самцов, которым подкожно вводили линию клеток аденокарциномы молочной железы, $n=4$. * — статистически значимые различия, $p<0,05$.

Fig. 2. Changes in the body weight of experimental animals by groups during the experiment at the early stages of the study (3 months) and in the late stages of the study (9 months). The abscissa indicates the day after transplantation, the ordinate indicates weight, g. Хондросферы — a group of males and females implanted with TEP based on human chondrocytes, $n=24$; Физ. раствор — a group of males and females subcutaneously injected with saline solution, $n=24$; ИПСК P2 — a group of males who TEP based on iPSCs with $\beta 2m$ gene knockout was implanted, differentiated in the chondrogenic direction, $n=8$; ИПСК P1 — group of males implanted with TEP based on iPSCs differentiated in the chondrogenic direction, $n=8$; МСК — a group of males implanted with MSCs, $n=2$; MDA231 — a group of males subcutaneously injected with a line of breast adenocarcinoma cells, $n=4$. * — statistically significant differences, $p<0.05$.

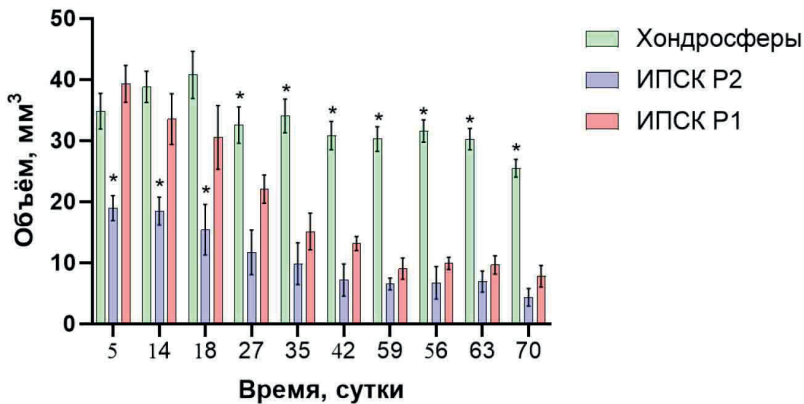


Рис. 3. Изменение медиан объёмов образований (мм³) в месте введения у животных в опытных группах с течением времени на ранних сроках исследования. По оси абсцисс обозначены сутки после введения. Хондросферы — группа введения хондросфер на основе хондроцитов человека; ИПСК P2 — группа введения Хондросфер на основе ИПСК с нокаутом гена $\beta 2m$ и дифференцированных в хондрогенном направлении; ИПСК P1 — группа введения Хондросфер на основе ИПСК, дифференцированных в хондрогенном направлении; * — статистически значимые различия по сравнению с двумя другими группами, $p < 0,05$.

Fig. 3. Changes in the median volumes of formations (mm³) at the injection site in animals in experimental groups over time in the early stages of the study. The abscissa indicates the day after administration. Chondrospheres — group of administration of Chondrospheres based on human chondrocytes; ИПСК P2 — group of administration of Chondrospheres based on iPSCs with knockout of gene $\beta 2m$ and differentiated in the chondrogenic direction; ИПСК P1 — group of administration of Chondrospheres based on iPSCs differentiated in the chondrogenic direction; * — statistically significant differences compared to the other two groups, $p < 0.05$.

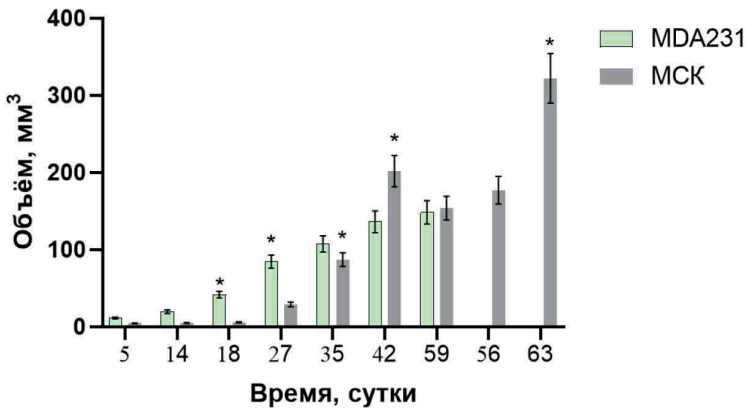


Рис. 4. Изменение медиан объёмов новообразований (мм³) в месте введения у животных в положительных контрольных группах с течением времени на ранних сроках исследования. По оси абсцисс обозначены сутки после введения. MCK — подкожное введение линии MCK; MDA231 — подкожное введение линии клеток аденокарциномы молочной железы; * — статистически значимые различия по сравнению с предыдущим измерением, $p < 0,05$.

Fig. 4. Changes in the median volumes of neoplasms (mm³) at the injection site in animals in positive control groups over time in the early stages of the study. The abscissa indicates the day after administration. MCK — subcutaneous injection of the MSCs line; MDA231 — subcutaneous injection of the breast adenocarcinoma cell line; * — statistically significant differences compared to the previous measurement, $p < 0.05$.

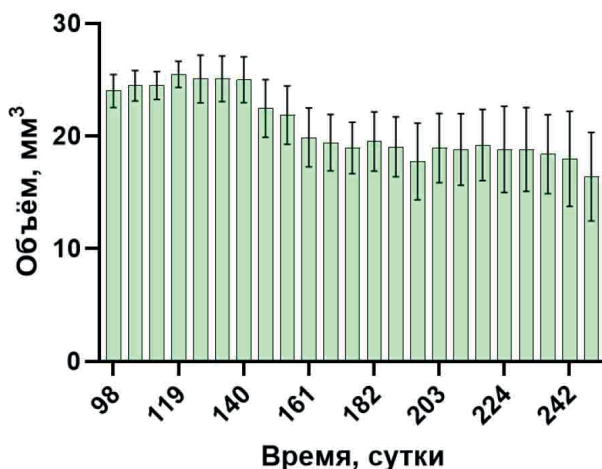


Рис. 5. Изменение медиан объёмов инокулятов (мм³) в месте введения у животных в опытной группе введения Хондросфер на основе хондроцитов человека с течением времени на поздних сроках исследования. По оси абсцисс обозначены сутки после введения.

Примечание: измерение объёмов образований в группах закола дифференцированных производных ИПСК не измерялись после 94-го дня эксперимента, поскольку визуально место закола не отличалось от окружающих тканей.

Fig. 5. Changes in the median volumes of inoculates (mm³) at the injection site in animals in the experimental group of administration of Chondrospheres based on human chondrocytes over time at the late stages of the study. The abscissa indicates the day after administration.

Note: the measurement of the volume of formations in the groups of administration of differentiated ISC derivatives was not measured after day 94 of the experiment, since visually the puncture site did not differ from the surrounding tissues.

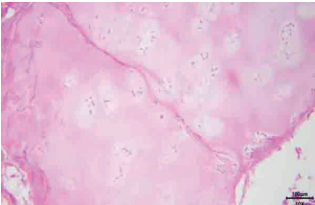
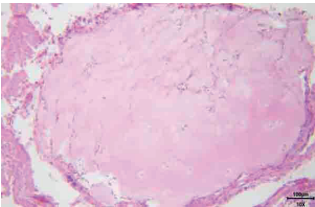
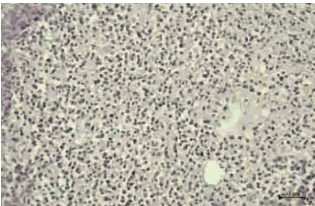
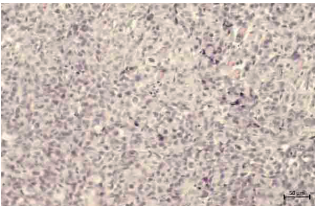
ских препаратах выявлена недифференцированная опухоль с выраженным клеточным и ядерным плеоморфизмом и несколькими митотическими фигурами. Кроме того, наблюдалось несколько областей с веретенообразными клетками. Обнаружены основные признаки десмопластической стромы, что характерно для рака молочной железы человека (табл. 3). В группе введения МСК гистологический анализ места имплантации выявил небольшие, полигональные клетки, имеющие нечёткие границы и плеоморфные перекрывающиеся ядра. Встречались митотические фигуры. Умеренное количество амфифильной и зернистой цитоплазмы. Таким образом, присутствовала большая часть признаков, позволяющих дифференцировать образец как опухолеподобное образование с преобладанием стволовых клеток (табл. 3).

Детекция ДНК человека в тканях и органах мыши

При анализе образцов цельной крови, образцов тканей и органов мышей из опытных групп ДНК человека была обнаружена только в области закола Хондросфер. В остальных тканях и органах самцов и самок мышей следов анализируемого ПТИ не было обнаружено (LOQ < 0,001 нг ДНК). Таким образом, характер биораспределения исследуемого продукта на ранних сроках наблюдения (через 3 мес. после введения) и на поздних сроках наблюдения (через 9 мес. после введения) оптимален для рекомендованного внутрисуставного пути введения. В группах подкожного введения опухолевой культуры или МСК человека человеческая ДНК была детектирована в месте введения и в тонком кишечнике.

Таблица 3. Гистологические препараты имплантатов на разных сроках после подкожного введения на сроке 3 мес. после имплантации. Увеличение — 10×, 20×. Масштабный отрезок — 100 мкм, 50 мкм

Table 3. Histological preparations of implants at different periods after subcutaneous injection at a period of 3 months after implantation. Magn. ×10, ×20. The scale segment is 100 μm, 50 μm

Группа	Метод окраски	
	Гематоксилин-эозин	Альциановый синий
Хондросферы на основе хондроцитов человека		
Хондросферы на основе ИПСК-производных		
Хондросферы на основе ИПСК-производных с нокаутом гена β2m		
MDA231		
МСК		

Обсуждение результатов

Получение трёхмерных сфероидных продуктов на основе аутологичных хондроцитов человека с помощью органоидной технологии является достаточно перспективным направлением для создания продуктов для регенеративной медицины. Подобные технологии активно применяются за рубежом для клеточной терапии объёмных очаговых дефектов гиалинового хряща коленного сустава. Несмотря на то, что разрабатываемый нами продукт аналогичен по технологии производства и по своему составу препарату от компании «Co.don», его получают по усовершенствованной технологии, что требует новых исследований безопасности. Согласно существующему в нашей стране законодательству в области обращения лекарственных препаратов, исследование фармакокинетики ПТИ включает анализ биораспределения, которое характеризует миграционный потенциал клеток в составе клеточного конструктора. Исследования биораспределения продукта Spherohx™ после консультации разработчика с регуляторными органами проводили на животных с иммунодефицитом [25]. Проведённое нами исследование биораспределения на иммунодефицитных мышах линии Balb/c Nude с использованием ПЦР с детекцией в агарозном геле показало отсутствие человеческой ДНК в тканях и органах, удалённых от зоны подкожной имплантации продукта. В опытных группах введения ПТИ на основе клеток человека человеческая ДНК была детектирована только в месте имплантации. В группах положительного контроля (подкожное введение опухолевой культуры или МСК человека) ДНК человека была детектирована в месте введения и в тонком кишечнике, что свидетельствует о повышенной миграционной активности данных линий клеток. Таким образом, в рамках тестирования безопасности проведение оценки биораспределения ПТИ, предназна-

ченного для имплантации человеку, представляется целесообразным с помощью описанного подхода.

Технология индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), которая позволяет легко получать клетки, способные к длительному самообновлению и способностью к дифференцировке в любой тип соматических клеток, в т. ч. хондроциты, может преодолеть ограничения, связанные с аутологичными хондроцитами [17]. Клеточные технологии, связанные с использованием ИПСК в качестве источника клеток для терапии повреждений хрящевой ткани, в настоящее время активно развиваются, но протоколы получения хондроцитарных производных из ИПСК и процессы их культивирования в 3D-условиях не унифицированы, а готовых продуктов из данных клеток на рынке не представлено [18]. Поскольку цель нашего исследования состояла в изучении биораспределения нового ПТИ для терапии поражений суставного хряща человека на основе ИПСК, дифференцированных в хондрогенном направлении, то клетки были проверены на наличие экспрессии хондроцитарных генов методом ПЦР.

Для изучения биораспределения использовали иммунодефицитных мышей линии Balb/c Nude. Данная линия животных широко используется в фундаментальных и доклинических исследованиях различных ксенотрансплантатов, в т. ч. на основе хондроцитов человека [4]. В своём исследовании мы прибегали к подкожной имплантации Хондросфер, поскольку эта процедура менее инвазивна, легко масштабируема и проста в реализации по сравнению с имплантацией в сустав мелких лабораторных животных, за зоной инокуляции легко наблюдать. Дозу однократного введения ПТИ рассчитывали, исходя из предполагаемой терапевтической дозы для человека согласно размеру дефектов хрящевой ткани — 10–70 сфероидов на 1 см² повреждённой

ткани [25]. Для мышей доза составила пять сфероидов на одно животное.

Морфометрические данные не выявили значительных изменений массы тела у опытных групп по сравнению с группой контроля, что говорит об отсутствии системного патологического действия исследуемого продукта. Размеры инокулятов с течением времени уменьшались, что свидетельствует об отсутствии гипертрофии и компактизации вводимого продукта, в связи с отсутствием механической нагрузки на имплантат. Кроме того, наблюдался значимо меньший объём образований в группах введения Хондросфер на основе ИПСК, дифференцированных в хондрогенном направлении, что может быть связано с изначально меньшим размером клеток. Влияния со стороны используемого протокола дифференцировки клеток не наблюдалось.

Для оценки формирования стабильной хрящевой ткани в месте введения ПТИ места закола были исследованы с помощью гистологического анализа. В результате анализа полученных препаратов мы наблюдали образование хрящевой ткани уже через 90 сут после имплантации, что говорит об успешной интеграции сфероидов в тканях мыши. Стоит заметить, что ПТИ на основе ИПСК-производных также формировали нормальную хрящевую ткань. На поздних сроках (через 9 мес.) хрящевые имплантаты также успешно формировали нормальную хрящевую ткань, что говорит об их состоятельности.

Для проверки распределения биоптаты органов и тканей мыши по прошествии 90 сут после имплантации были качественно оценены путём анализа на наличие экспрессии видоспецифичной для человека последовательности гена цитохром-С-оксидазы 1 (*COI*). Метод ПЦР является одним из методов выбора для исследования биораспределения продуктов на основе соматических клеток [25]. Согласно проведённым в мире исследованиям, детекция человече-

ской ДНК методом ПЦР в сочетании с другим методом визуализации распределения исследуемого препарата, например, с гистологией, является достаточным методологическим подходом для анализа биораспределения. Известно, что ПЦР является высокочувствительным методом анализа, который в некоторых случаях может обнаружить одну копию целевой ДНК, и поэтому разделение рабочих зон — выделения ДНК, подготовки смеси, детекции результатов — и контроль загрязнения на каждом этапе имеют решающее значение для лаборатории. Хотя это не обсуждается в этой статье, предполагается, что все манипуляции, связанные с проведением анализа ПЦР, соответствуют надлежащей лабораторной практике (GLP).

Выводы

В настоящей работе было проведено исследование биораспределения ПТИ «Хондросферы», представляющего собой 3D-структуру на основе хондроцитов человека. Альтернативным источником при изготовлении изучаемого ПТИ были выбраны ИПСК человека, дифференцированные в хондрогенном направлении. Биораспределение оценивали через 3 и 9 мес. после подкожной имплантации продукта мышам линии Balb/c Nude. В качестве контроля животным был введён физ. р-р. В ходе исследования в местах закола продукта наблюдали образование стабильной, зрелой хрящевой ткани с характерной морфологией без признаков аномальной пролиферации. Клеточная миграция за пределы области имплантации отсутствовала. Полученные результаты позволяют заключить, что разработанный нами ПТИ «Хондросферы» характеризуется нормальным биораспределением в пределах зоны введения, хорошо интегрируется в подлежащие ткани и может быть рекомендован для дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Богомякова М.Е., Еремеев А.В., Лагарькова М.А. «Свой среди чужих»: можно ли создать гипоиммунотогенные линии плюрипотентных стволовых клеток? *Молекулярная биология*. 2019;53(5):725–740. [Bogomiakova M.E., Eremeev A.V., Lagarkova M.A. «Svoy sredi chuzhikh»: mozhno li sozdat' gipoimmunogennyye linii pluryipotentnykh stvolovykh kletok? [At home among strangers: Is it possible to create hypoimmunogenic pluripotent stem cell lines?]. *Molekulyarnaya biologiya* [Molecular Biology]. 2019;53(5):725–740. (In Russian)]. DOI: 10.1134/S0026898419050045
2. Пикина А.С., Голубинская П.А., Ручко Е.С., Коженевская Е.В., Поспелов А.Д., Бабаев А.А., Еремеев А.В. Исследование биораспределения биомедицинского клеточного продукта на основе хондроцитов человека при имплантации мышам линии BALB/C Nude. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2023;4:123–130. [Pikina A.S., Golubinskaya P.A., Ruchko E.S., Kozhenevskaya E.V., Pospelov A.D., Babaev A.A., Eremeev A.V. Issledovanie bioraspredeleniya biomeditsinskogo kletchnogo produkta na osnove khondrotsitov cheloveka pri implantatsii mysham linii BALB/C Nude [Assessing biodistribution of biomedical cellular product based on human chondrocytes following implantation to BALB/C nude mic]. *Meditsina ekstremal'nykh situatsiy* [Extreme Medicine]. 2023;4:123–130. (In Russian)]. DOI: 10.47183/mes.2023.057
3. Abe K., Yamashita A., Morioka M., Horike N., Takei Y., Koyamatsu S., Okita K., Matsuda S., Tsumaki N. Engraftment of allogeneic iPSC cell-derived cartilage organoid in a primate model of articular cartilage defect. *Nat. Commun.* 2023;14(1):804. DOI: 10.1038/s41467-023-36408-0
4. Apelgren P., Amoroso M., Lindahl A., Brantsing C., Rotter N., Gatenholm P., Kölby L. Chondrocytes and stem cells in 3D-bioprinted structures create human cartilage in vivo. *PLoS One*. 2017;12(12): e0189428. DOI: 10.1371/journal.pone.0189428
5. Bogomiakova M.E., Sekretova E.K., Anufrieva K.S., Khabarova P.O., Kazakova A.N., Bobrovsky P.A., Grigoryeva T.V., Eremeev A.V., Lebedeva O.S., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A. iPSC derived cells lack immune tolerance to autologous NK cells due to imbalance in ligands for activating and inhibitory NK-cell receptors. *Stem Cell Res Ther.* 2023;14(1):77. DOI: 10.1186/s13287-023-03308-5
6. Bogomiakova M.E., Sekretova E.K., Eremeev A.V., Shuvalova L.D., Bobrovsky P.A., Zerkalnikova E.A., Lebedeva O.S., Lagarkova M.A. Derivation of induced pluripotent stem cells line (RCPMi007-A-1) with inactivation of the beta-2-microglobulin gene by CRISPR/Cas9 genome editing. *Stem Cell Res.* 2021;55:102451. DOI: 10.1016/j.scr.2021.102451
7. Delanois R.E., Etcheson J.I., Sodhi N., Henn R.F., Gwam C.U., George N.E., Mont M.A. Biologic therapies for the treatment of knee osteoarthritis. *J. Arthroplasty*. 2019;34(4):801–813. DOI: 10.1016/j.arth.2018.12.001
8. Eremeev A., Belikova L., Ruchko E., Volovikov E., Zubkova O., Emelin A., Deev R., Lebedeva O., Bogomazova A., Lagarkova M. Brain organoid generation from induced pluripotent stem cells in home-made mini bioreactors. *J. Vis. Exp.* 2021;178. DOI: 10.3791/62987
9. Eremeev A., Pikina A., Ruchko Y., Bogomazova A. Clinical potential of cellular material sources in the generation of iPSC-based products for the regeneration of articular cartilage. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(19):14408. DOI: 10.3390/ijms241914408
10. Fickert S., Gerwien P., Helmert B., Schattenberg T., Weckbach S., Kaszkin-Bettag M., Lehmann L. One-year clinical and radiological results of a prospective, investigator-initiated trial examining a novel, purely autologous 3-dimensional autologous chondrocyte transplantation product in the knee. *Cartilage*. 2012;3(1):27–42. DOI: 10.1177/1947603511417616
11. European Medicines Agency. *Spherex: Spheroids of human autologous matrix-associated chondrocytes*. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/spherex>
12. Hwang J.J., Choi J., Rim Y.A., Nam Y., Ju J.H. Application of induced pluripotent stem cells for disease modeling and 3d model construction: Focus on osteoarthritis. *Cells*. 2021;10(11):3032. DOI: 10.3390/cells10113032
13. Jiang Y., Tuan R.S. Bioactivity of human adult stem cells and functional relevance of stem cell-derived extracellular matrix in chondrogenesis. *Stem Cell Res. Ther.* 2023;14(1):160. DOI: 10.1186/s13287-023-03392-7
14. Kawata M., Mori D., Kanke K., Hojo H., Ohba S., Chung U.I., Yano F., Masaki H., Otsu M., Nakauchi H., Tanaka S., Saito T. Simple and robust differentiation of human pluripotent stem cells toward chondrocytes by two small-molecule compounds. *Stem Cell Reports*. 2019;13(3):530–544. DOI: 10.1016/j.stemcr.2019.07.012
15. Kreuz P.C., Kalkreuth R.H., Niemeyer P., Uhl M., Erggelet C. Long-term clinical and MRI results of matrix-assisted autologous chondrocyte implantation for articular cartilage defects of the knee. *Cartilage*. 2019;10(3):305–313. DOI: 10.1177/1947603518756463
16. Madrid M., Sumen C., Aivio S., Saklayen N. Autologous induced pluripotent stem cell-based cell therapies: Promise, progress, and challenges. *Curr. Protoc.* 2021;1(3):e88. DOI: 10.1002/cpz1.88
17. Murphy C., Mobasheri A., Tancos Z., Kobilák J., Dinnyés A. The potency of induced pluripotent stem cells in cartilage regeneration and osteoarthritis treatment. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018;1079:55–68. DOI: 10.1007/5584_2017_141
18. Nakamura A., Murata D., Fujimoto R., Tamaki S., Nagata S., Ikeya M., Toguchida J., Nakayama K. Bio-3D printing iPSC-derived human chondrocytes for articular cartilage regeneration. *Biofabrication*. 2021;13(4). DOI: 10.1088/1758-5090/ac1c99

19. Niemeyer P., Laute V., Zinser W., John T., Becher C., Diehl P., Kolombe T., Fay J., Siebold R., Fickert S. Safety and efficacy of matrix-associated autologous chondrocyte implantation with spheroid technology is independent of spheroid dose after 4 years. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 2020;28(4):1130–1143. DOI: 10.1007/s00167-019-05786-8
20. Price A.J., Alvand A., Troelsen A., Katz J.N., Hooper G., Gray A., Carr A., Beard D. Knee replacement. *Lancet.* 2018;392(10158):1672–1682. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32344-4
21. Riedl M., Vadalà G., Papalia R., Denaro V. Three-dimensional, scaffold-free, autologous chondrocyte transplantation: A systematic review. *Orthop. J. Sports Med.* 2020;8(9):2325967120951152 DOI: 10.1177/2325967120951152
22. Shah S.S., Mithoefer K. Scientific developments and clinical applications utilizing chondrons and chondrocytes with matrix for cartilage repair. *Cartilage.* 2021;13(1_suppl):1195S–1205S. DOI: 10.1177/1947603520968884
23. Yamanaka S. Pluripotent stem cell-based cell therapy — promise and challenges. *Cell Stem Cell.* 2020;27(4):523–531. DOI: 10.1016/j.stem.2020.09.014
24. Yamashita A., Morioka M., Yahara Y., Okada M., Kobayashi T., Kuriyama S., Matsuda S., Tsumaki N. Generation of scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPSCs. *Stem Cell Reports.* 2015;4(3):404–418. DOI: 10.1016/j.stemcr.2015.01.016
25. Zscharnack M., Krause C., Aust G., Thümmel C., Peinemann F., Keller T., Smink J.J., Holland H., Somerson J.S., Knauer J., Schulz R.M., Lehmann J. Preclinical good laboratory practice-compliant safety study to evaluate biodistribution and tumorigenicity of a cartilage advanced therapy medicinal product (ATMP). *J. Transl. Med.* 2015;13:160. DOI: 10.1186/s12967-015-0517-x

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Голубинская Полина Александровна*, к.м.н., ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России»;
e-mail: polinapigeon@gmail.com

Polina A. Golubinskaya*, Cand. Sci. (Med.), Federal Scientific and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine named after Yu.M. Lopukhin of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: polinapigeon@gmail.com

Пикина Арина Сергеевна, ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России»;
e-mail: arina.pikina@yandex.ru

Arina S. Pikina, Federal Scientific and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine named after Yu.M. Lopukhin of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: arina.pikina@yandex.ru

Ручко Евгений Сергеевич, ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России»;
e-mail: ruchkoevgeny@yandex.ru

Eugene S. Ruchko, Federal Scientific and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine named after Yu.M. Lopukhin of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: ruchkoevgeny@yandex.ru

Кожневская Евгения Владимировна, ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»;
e-mail: kozhenevskaya@neuro.nnov.ru

Evgeniya V. Kozhenevskaya, Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod;
e-mail: kozhenevskaya@neuro.nnov.ru

Поспелов Антон Джонович, ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»;
e-mail: eso103163@gmail.com

Anton Dz. Pospelov, Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod;
e-mail: eso103163@gmail.com

Бабаев Алексей Александрович, к.б.н., ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»;

e-mail: babaev@unn.ru

Aleksej A. Babaev, Cand. Sci. (Biol.), Federal Scientific and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine named after Yu.M. Lopukhin of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: babaev@unn.ru

Иванов Виктор Андреевич, ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России»;

e-mail: vanov.va@inbox.ru

Viktor A. Ivanov, Federal Scientific and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine named after Yu.M. Lopukhin of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: vanov.va@inbox.ru

Беспярых Юлия Андреевна, к.б.н., ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России»;

e-mail: JuliaBes@rcpcm.org

Julia A. Bespyatykh, Cand. Sci. (Biol.), Federal Scientific and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine named after Yu.M. Lopukhin of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: JuliaBes@rcpcm.org

Шнайдер Лев Сергеевич, к.м.н., ГБУЗ Московский Клинический Научный Центр им. А.С. Логинова ДЗМ;

e-mail: shnayderlev@gmail.com

Lev S. Shnayder, Cand. Sci. (Med.), Moscow Clinical Scientific Center named after A.S. Loginov of the Moscow Health Care Department;

e-mail: shnayderlev@gmail.com

Еремеев Артём Валерьевич, к.б.н., ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России»;

e-mail: art-eremeev@yandex.ru

Artem V. Ereemeev, Cand. Sci. (Biol.), Federal Scientific and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine named after Yu.M. Lopukhin of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: art-eremeev@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author