

Исследование репродукции онколитических вирусов в органных культурах лимфоидных опухолей человека

Ф.Э. Бабаева¹, А.В. Липатова², Д.В. Кочетков², П.М. Чумаков², С.К. Кравченко¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России;

Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4;

²ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН»; Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32

Контакты: Фатима Эльшанова Бабаева fatima-babayeva1990@yandex.ru

Онколитические вирусы являются перспективными средствами для лечения различных типов опухолей, в том числе злокачественных неходжкинских лимфом. С целью выявления наиболее эффективных кандидатов из широкой панели непатогенных противоопухолевых штаммов в работе проведено исследование их способности к репродукции в краткосрочных культурах клеток лимфоидных опухолей. Также опухолевые культуры клеток были охарактеризованы в отношении наличия на их поверхности специфических вирусных рецепторов CD54, CD55, CD155.

Ключевые слова: онколитические вирусы, лимфомы, химиотерапия, иммунотерапия, культуры клеток

Для цитирования: Бабаева Ф.Э., Липатова А.В., Кочетков Д.В. и др. Исследование репродукции онколитических вирусов в органных культурах лимфоидных опухолей человека. Онкогематология 2019;14(4):84–9.

DOI: 10.17650/1818-8346-2019-14-4-84-89

The study of oncolytic viruses reproduction in organ cultures of human lymphoid tumors

F.E. Babaeva¹, A.V. Lipatova², D.V. Kochetkov², P.M. Chumakov², S.K. Kravchenko¹

¹National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia; 4 Novyy Zykovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia

²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences; 32 Vavilova St., Moscow 119991 Russia

Oncolytic viruses are promising agents for the treatment of various types of tumors, including malignant non-Hodgkin lymphomas. In order to identify the most effective candidates from a wide panel of non-pathogenic antitumor strains, a study was carried out of their ability to reproduce in short-term cultures of lymphoid tumor cells. Also, tumor cell cultures were characterized in relation to the presence of specific viral receptors CD54, CD55, CD155 on their surface.

Key words: oncolytic viruses, lymphomas, chemotherapy, immunotherapy, cell cultures

For citation: Babaeva F.E., Lipatova A.V., Kochetkov D.V. et al. The study of oncolytic viruses reproduction in organ cultures of human lymphoid tumors. Onkogematologiya = Oncohematology 2019;14(4):84–9. (In Russ.).

Введение

Опухоли лимфоидной природы представляют гетерогенную группу злокачественных В- и Т/НК-клеточных лимфопролиферативных заболеваний. Ежегодно диагностируется около 25 тыс. случаев неходжкинских лимфом [1]. В России заболеваемость составляет 2,8 % от всех злокачественных новообразований. В настоящее время существует множество протоколов лечения, включающих применение химио-, радиотерапии, а также различных таргетных препаратов [2–4].

Проблема лечения первично резистентных форм и устойчивых к терапии рецидивов до сих пор остается нерешенной. Нельзя не отметить ряд существенных побочных эффектов, возникающих при проведении

химиотерапии, которые, с одной стороны, ухудшают качество жизни пациентов, с другой — подавляют противоопухолевый иммунный ответ и, как следствие, опухолевые клетки приобретают устойчивость к проводимой терапии. В качестве новых перспективных противоопухолевых средств рассматриваются различные непатогенные штаммы онколитических вирусов [5–8]. На различных стадиях клинических испытаний находятся десятки препаратов, предназначенных как для монотерапии, так и для комбинированной терапии. Существенным препятствием для широкого внедрения виротерапии является непредсказуемость эффективности отдельных вирусных штаммов, обусловленная различиями в чувствительности опухолей у разных пациентов. Одной из ключевых стадий

вирусного онколиза является интернализация вирусных частиц, в которой существенную роль играют отдельные трансмембранные белки, обеспечивающие связывание вирионов, – вирусные рецепторы. Для разработки эффективных виротерапевтических средств необходимо детальное исследование всех этапов развития вирусной инфекции в опухолевых клетках лимфоидной природы, для чего необходимы адекватные клеточные модели для экспериментов как *in vitro*, так и *in vivo*.

Впервые модельные линии лимфоидных опухолей были получены в 1961 г. от нигерийских пациентов с лимфомой Беркитта: Raji – наиболее известная клеточная линия этой панели [8]. В 1971 г. J. Minowada и соавт. получили линии гемопоэтических клеток из периферической крови пациента с рецидивом Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза [9]. В то же время К. Nilsson занимался активным изучением культур В-клеточного происхождения [10]. Несмотря на тестирование для культивирования клеток различных питательных сред с добавлением ряда факторов роста, таких как интерлейкин 2, интерлейкин 7, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, получение культур лимфоидного ряда остается трудной задачей. В ходе культивирования отмечаются значительное снижение жизнеспособности клеток, их загрязнение макрофагами и фибробластами стромы, что представляет существенную проблему.

Отличие от модельных культур краткосрочные органнне и первичные культуры опухолевых клеток могут служить более адекватной моделью для испытания новых противоопухолевых препаратов. Разработка методики их получения является отдельной исследовательской задачей.

В работе изучались онколитические свойства 5 штаммов энтеровирусов из панели живых энтеровирусных вакцин (ЖЭВ) [11]. Безопасность этих штаммов была подтверждена в ходе масштабных испытаний в 1970-е годы, также установлена их терапевтическая активность на больных с различными онкопатологиями [11, 12]. Также в исследованиях был испытан вакцинный штамм вируса везикулярного стоматита (Indiana), являющийся хорошо изученной моделью с подробно описанным механизмом онколиза [13–15].

Материалы и методы

Получение краткосрочных культур лимфоидных клеток. В проведенном нами исследовании для приготовления культур использовались биоптаты опухолей лимфоидной природы, полученные от пациентов с диагнозом неходжкинской лимфомы до начала противоопухолевой терапии. Образцы получены в НМИЦ гематологии в период с мая 2017 г. по декабрь 2018 г. Гистологическая характеристика образцов приведена в табл. 1. Методика получения краткосрочных лимфоидных культур отработана путем тщательного подбора оптимальных условий культивирования.

Таблица 1. Клиническая характеристика первичных линий лимфоидных клеток

Table 1. Clinical characteristics of primary lymphoid cell lines

| Характеристика Characteristic | ФЛ1–2 FL1–2 | ФЛ3 FL3 | ДБККЛ DBLCL |
|---|----------------|------------|----------------|
| Количество образцов Number of samples | 15 | 5 | 5 |
| Медиана возраста пациентов, лет Median age of patients, years | 54 | 48 | 51,8 |
| Стадия Stage: | | | |
| I | – | – | – |
| II | – | – | – |
| III | 1 | 1 | 2 |
| IV | 14 | 4 | 3 |
| Ki-67, %: | | | |
| 10–15 | 9 | 1 | 0 |
| 20–40 | 6 | 2 | 0 |
| 60–80 | 0 | 2 | 5 |
| Уровень лактатдегидрогеназы, Ед/л: Lactate dehydrogenase level, U/L: | | | |
| больше нормы more than normal | 10 | 4 | 3 |
| норма normal | 5 | 1 | 2 |
| Вовлечение костного мозга Bone marrow involvement | 10 | 2 | 1 |
| Вовлечение селезенки Spleen involvement | 5 | 0 | 2 |
| Лейкоциты: White blood cells: | | | |
| выше нормы more than normal | 3 | 1 | 0 |
| Международный прогностический индекс: International Prognostic Index: | | | |
| низкий риск low risk | 3 | 0 | 0 |
| промежуточный риск intermediate risk | 9 | 2 | 3 |
| высокий риск high risk | 3 | 3 | 2 |
| Средний процент жизнеспособных клеток в культуре The average percentage of viable cells in culture | 88,7 | 86 | 87,2 |

Примечание. Здесь и в табл. 2: ФЛ1–2 – фолликулярная лимфома 1–2-го цитологического типа; ФЛ3 – фолликулярная лимфома 3-го цитологического типа; ДБККЛ – диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома.
 Note. Here and in the table 2: FL1–2 – 1st–2nd cytological type follicular lymphoma; FL3 – 3rd cytological type follicular lymphoma; DBLCL – diffuse B-large cell lymphoma.

Фрагменты опухолевой ткани, полученные во время операций и биопсий, помещали в стерильные пробирки с охлажденной до температуры +4 °С средой DMEM (ПанЭко, Россия), содержащей антибактериальные препараты стрептомицин (50 мкг/мл) и пенициллин (50 ед/мл) (ПанЭко, Россия).

Материал хранили при температуре +4 °С не более 72 ч. Культуры получали путем фракционирования опухолевого материала с помощью специальных нейлоновых сеточек с отверстиями размером 100 мкм (Cell Strainer, SPL Lifesciences, Корея) и пластикового пестика.

Полученный опухолевый субстрат промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) в объеме 15 мл. Далее материал наслаивали на раствор фикола с плотностью 1,077 г/см³ (ПанЭко, Россия) в соотношении 10 мл раствора фикола и 15 мл суспензии, содержащей опухолевые клетки. Центрифугирование выполняли в течение 30 мин со скоростью 650 g, с минимальной скоростью разгона и остановки при температуре 18 °С. Кольцо, содержащее опухолевые клетки, промывали PBS, повторно центрифугировали в течение 10 мин при 1200 g. Клеточный осадок суспендировали в 5–10 мл среды RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 10 % бычьей сыворотки, пенициллин и стрептомицин в стандартных концентрациях, после чего инкубировали при температуре 37 °С. Процент живых клеток оценивали предварительно путем подсчета в аппарате Countess automated cell counter (Invitrogen, США) после окрашивания трипановым синим при температуре 20 °С.

Исследование онколитической активности вакцинных штаммов. В качестве тестируемых вирусов использовали следующие непатогенные штаммы:

- штамм ЖЭВ14, родственный вирусу Coxsackie B5;
- штамм ЖЭВ15, родственный вирусу Coxsackie B6;
- штамм ЖЭВ7, родственный вирусу ECHO12;
- вакцинный штамм полиовируса 1-го типа (PV1S, Сэбин);
- штамм ЖЭВ8, родственный вирусу Coxsackie A7;
- вирус везикулярного стоматита (штамм Indiana).

Полученные клеточные культуры засеивали в 96-луночные планшеты (4–6 тыс. клеток/луночку) и через сутки заражали вирусом в широком диапазоне множественности заражения (MOI = 0,001–100). Репродукцию вируса в линиях опухолевых клеток оценивали путем определения вирусного титра через 72 ч после заражения клеток из образцов, зараженных MOI = 1. Суспензию, содержащую вирус и клетки, отбирали, после 3-кратного замораживания и оттаивания центрифугировали и из полученного супернатанта готовили 10-кратные разведения, которыми инфицировали клетки чувствительной линии RD, рассеянной на 96-луночные планшеты при степени

конфлюэнтности 70 %. После заражения клеток через 4 дня проводили визуальную оценку состояния монослоя и расчет величины TCID₅₀ методом Рида и Менча [16].

Проточная цитофлуориметрия. Для подтверждения В-клеточной направленности полученных первичных культур из опухолевого субстрата методом проточной цитометрии проводили исследование лимфоидной панели CD19, CD10, CD20, CD5, CD3, kappa/lambda. Также выполняли оценку экспрессии мембранных рецепторов с помощью антител фирмы Biotin: антитела к антигену дифференцировки 155 (CD155, BV421, cat#743 252), антитела к антигену дифференцировки 46 (CD46, BV510, cat#743 777), антитела к антигену дифференцировки 54 (CD54, APC, cat#559 771), антитела к антигену дифференцировки 160 (CD160, Alexa Fluor, cat#562 351), антитела к антигену дифференцировки 55 (CD55 PE, cat#341 030). Исследование проводили на аппарате FACS Canto II (BD Bioscience, США) (табл. 2).

Таблица 2. Процент клеток, экспрессирующих различные мембранные рецепторы, в образцах краткосрочных культур злокачественных лимфом

Table 2. The proportion of cells expressing different membrane receptors in samples of short-term malignant lymphomas cultures

| Антитело Antibody | ФЛ1–2 (n = 15) FL1–2 (n = 15) | ФЛ3 (n = 5) FL3 (n = 5) | ДБККЛ (n = 5) DBLCL (n = 5) |
|----------------------|-------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| CD54 | 54 | 48 | 51,8 |
| CD55 | 88,9 | 81,7 | 70 |
| CD160 | <1 | <1 | <1 |
| CD155 | <1 | <1 | <1 |
| CD46 | 71,4 | 81,8 | 70 |

Результаты и обсуждение

Резистентные к химиотерапии злокачественные лимфомы у взрослых и детей приводят к быстрой смерти пациентов. Непатогенные штаммы онколитических энтеровирусов представляются перспективными для лечения агрессивных и резистентных форм фолликулярных лимфом 1, 2 и 3-го цитологических типов, а также диффузных В-клеточных крупноклеточных лимфом.

Использованные штаммы были подробно изучены на различных клеточных моделях солидных опухолей *in vitro* и *in vivo* [17–21], однако ни в одном исследовании не рассматривались клеточные культуры опухолей лимфоидной природы. Мы использовали краткосрочные цитологически подробно охарактеризованные культуры клеток, стремясь получить максимально адекватную оценку способности панели непатогенных энтеровирусов реплицироваться на опухолевом субстрате. Культуры, вошедшие в исследование,

проходили жесткий контроль путем отбора образцов с содержанием опухолевых клеток более 95 % при жизнеспособности более 85 %.

Лимфоидные культуры демонстрировали существенные различия в способности к репродукции вакцинных штаммов. В культурах, как правило, эффективно репродуцировались штаммы ЖЭВ14 (Coxsackie B5), ЖЭВ7 (ECHO12) и PV1S. На рис. 1 представлена цветовая карта, отражающая эффективность репликации онколитических вирусов в различных лимфоидных культурах. Обращает на себя внимание образец фолликулярной лимфомы 3-го цитологического типа, клетки которой обладали высокой репликационной способностью в отношении всех испытанных непатогенных штаммов вирусов. Наряду с этим большинство клеточных культур оказались не способными реплицировать штаммы ЖЭВ8 и ЖЭВ15.

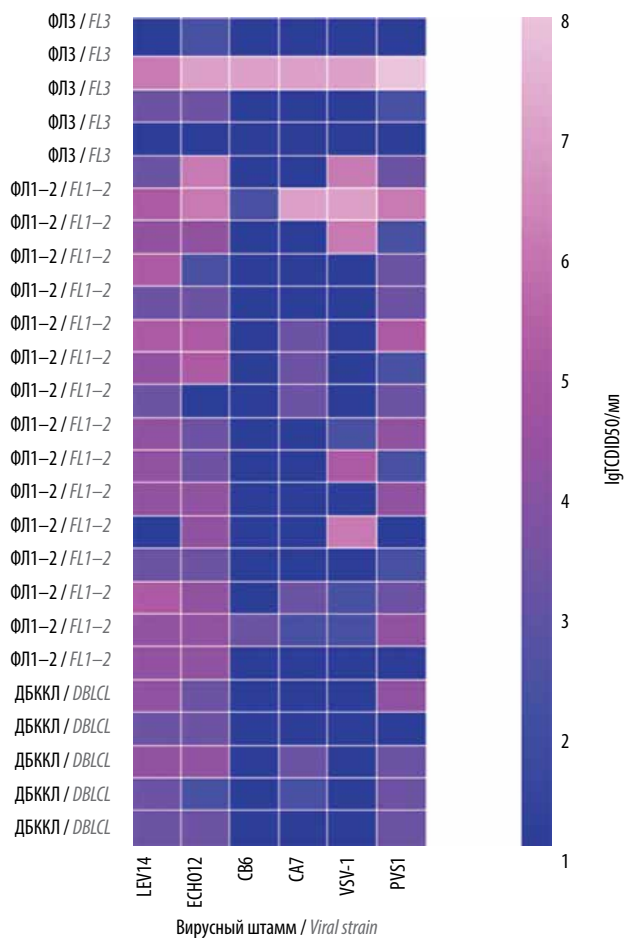


Рис. 1. Тепловая карта. Эффективность репликации вирусных штаммов в клетках краткосрочных культур злокачественных лимфом (72 ч после заражения). Здесь и на рис. 2: ФЛ1–2 – фолликулярная лимфома 1–2-го цитологического типа; ФЛ3 – фолликулярная лимфома 3-го цитологического типа; ДБККЛ – диффузная В-крупноклеточная лимфома

Fig. 1. Heat map. The replication efficiency of viral strains in cells of short-term malignant lymphomas cultures (72 hours after infection). Here and in the Fig. 2: FL1–2 – 1st–2nd cytological type follicular lymphoma; FL3 – 3rd cytological type follicular lymphoma; DBLCL – diffuse B-large cell lymphoma

Параллельно проводилась оценка экспрессии мембранных рецепторов, через которые вирус проникает в клетку.

На рис. 2 представлена тепловая карта, отражающая наличие рецепторов на опухолевых клетках.

Мы продемонстрировали, что в условиях культивирования, описанных выше, краткосрочные культуры, полученные из биоптатов, экспрессируют рецепторы CD54 и CD55 на поверхности клеток, необходимые для эффективного проникновения в клетки вирусов групп Coxsackie и ECHO, при этом полиовирусный рецептор CD155 практически не детектировался при проведении проточной цитометрии. Данный вопрос требует, несомненно, более детального исследования и подтверждения отсутствия данного гена на уровне транскрипции в образцах опухолевых культур лимфоидной природы. Тем не менее репродукция вакцинного штамма полиовируса 1-го типа в клетках отмечалась. Данный факт говорит о том, что, вероятнее всего, существуют альтернативные пути проникновения вирусов в клетки, например с использованием альтернативных рецепторов, микропиноцитоза и др. [22].

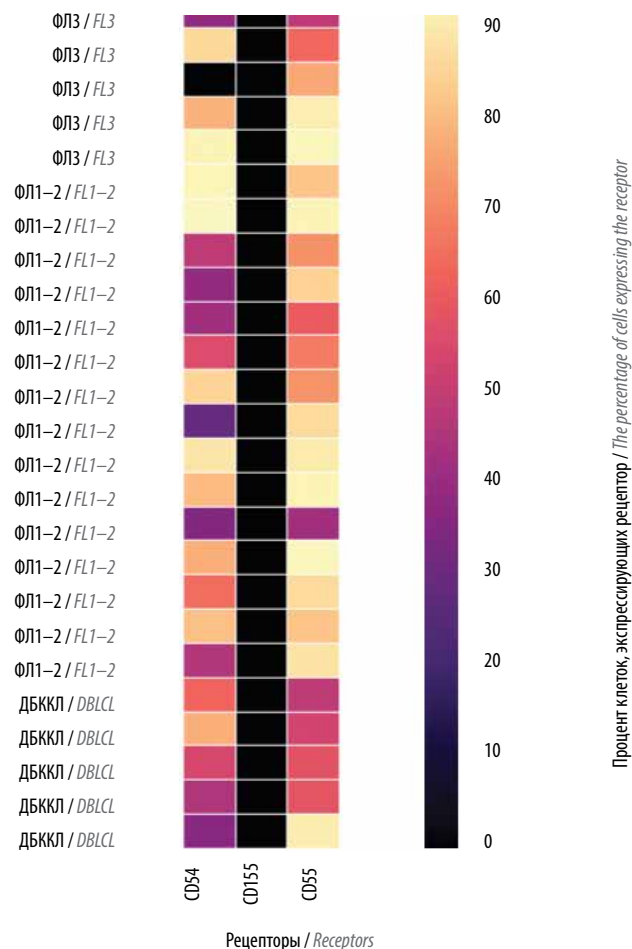


Рис. 2. Тепловая карта. Процент клеток, экспрессирующих мембранные рецепторы, необходимые для эффективного проникновения вирусов в клетку

Fig. 2. Heat map. The proportion of cells expressing membrane receptors required for effective penetration of viruses into the cell

Важно отметить, что процент клеток, экспрессирующих CD54 (ICAM-1), коррелировал со способностью клеток эффективно реплицировать штамм вируса везикулярного стоматита (коэффициент корреляции Пирсона 0,45; $p = 0,022$). Ранее мы показали, что для большинства солидных опухолей количественная оценка уровня экспрессии вирусных рецепторов не так важна, как сам факт наличия данного рецептора, пусть даже в небольшом количестве [17].

Предложенный метод оценки краткосрочных культур клеток лимфоидной природы будет иметь большое значение для будущих испытаний предложенной панели энтеровирусов, поскольку одновременная оценка экспрессии ряда вирусных рецепторов может представлять собой основу для разработки эффективного протокола прогнозирования реакции пациента на лечение с помощью того или иного виротерапевтического препарата. Подобный цитологический анализ может быть полезен в качестве критерия включения/исключения для максимизации эффективности терапии. Данное утверждение, безусловно, требует подтверждения соответствующими клиническими испытаниями. В дальнейшем следует

определить значение минимального уровня экспрессии вирусных рецепторов, приводящего к развитию эффективной вирусной инфекции в опухолевых клетках. В то же время важно помнить, что, несмотря на то что интернализация вируса является первым и, несомненно, крайне важным этапом, другие факторы, такие как сохранность системы врожденного противовирусного иммунитета, могут играть критическую роль в развитии терапевтического эффекта. Данные вопросы могут быть исследованы путем проведения полнотранскриптомного секвенирования, а также панорамного протеомного секвенирования образцов культур опухолевых клеток и последующей валидацией потенциальных биомаркеров.

Заключение

По результатам проведенного исследования можно предложить штаммы ЖЭВ14, ЖЭВ7 и PV15 в качестве перспективных иммунотерапевтических средств для дальнейшего изучения и использования в качестве одного из новых подходов к лечению опухолей лимфоидной природы как в монорежиме, так и в комбинации с химиотерапией.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Anderson J.R., Armitage J.O., Weisenburger D.D. Epidemiology of the nonHodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. *Project Ann Oncol* 1998;9(7):717–20.
- Phan M., Watson M.F., Alain T., Diallo J.S. Oncolytic viruses on drugs: achieving higher therapeutic efficacy. *ACS Infect Dis* 2018;4(10):1448–67. DOI: 10.1021/acsinfectdis.8b00144.
- Luminari S., Bellei M., Biasoli I., Federico M. Follicular lymphoma – treatment and prognostic factors. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2012;34(1):54–9. DOI: 10.5581/1516-8484.20120015.
- Магомедова А.У. Диффузная В-крупноклеточная лимфосаркома лимфоидных органов: клинические формы, лечение. Дис. ... д-ра мед. наук. М., 2008. С. 183–5. [Magomedova A.U. Diffusive large B-cell lymphosarcoma of lymphoid organs: clinical forms, treatment. Thesis ... of doctor of medical sciences. Moscow, 2008. Pp. 183–5. (In Russ)].
- Ungerechts G., Frenzke M.E., Yaiw K.C. et al. Mantle cell lymphoma salvage regimen: synergy between a reprogrammed oncolytic virus and two chemotherapeutics. *Gene Therapy* 2010;17(12):1506–16. DOI: 10.1038/gt.2010.103.
- Heinzerling L., Künzi V., Oberholzer P.A. et al. Oncolytic measles virus in cutaneous T-cell lymphomas mounts antitumor immune responses in vivo and targets interferon-resistant tumor cells. *Blood* 2005;106(7):2287–94. DOI: 10.1182/blood-2004-11-4558.
- Hanaauer J.D.S., Rengstl B., Kleinlützum D. et al. CD30-targeted oncolytic viruses as novel therapeutic approach against classical Hodgkin lymphoma. *Oncotarget* 2018;9(16):12971–81. DOI: 10.18632/oncotarget.24191.
- Namba M., Kimoto T. Culture conditions for a human lymphoma cell line (Raji) and their application to mutation research. *Gan* 1981;72(3):459–63.
- Minowada J., Ohnuma T., Moore G.E. Rosette-forming human lymphoid lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *J Nat Cancer Inst* 1972;49(3):891–5.
- Nilsson K. Human B-lymphoid cell lines. *Hum Cell* 1992;5(1):25–41.
- Ворошилова М.К., Горюнова А.Г., Горбачкова Е.А. и др. Изучение клеточного иммунитета у онкологических больных в процессе бессимптомной энтеровирусной инфекции. В кн.: Виротерапия и искусственная гетерогенизация опухолей. Зинатне, Рига, 1977. С. 17–19. [Voroshilova M.K., Goryunova A.G., Gorbachkova E.A. et al. The study of cellular immunity in cancer patients during asymptomatic enterovirus infection. In: Virotherapy and artificial tumor heterogenization. Zinatne, Riga, 1977; Pp. 17–19. (In Russ)].
- Чумаков П.М., Морозова В.В., Бабкин И.В. и др. Онколитические энтеровирусы. Молекулярная биология 2012;46:712–25. [Chumakov P.M., Morozova V.V., Babkin I.V. et al. Oncolytic enteroviruses. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 2012;46:712–25. (In Russ.).]
- Blackham A.U., Northrup S.A., Willingham M. et al. Molecular determinants of susceptibility to oncolytic vesicular stomatitis virus in pancreatic adenocarcinoma. *J Surg Res* 2014;187(2):412–26. DOI: 10.1016/j.jss.2013.10.032.
- Betancourt D.M. Vesicular stomatitis virus is a malleable oncolytic vector for the treatment of various malignancies. University of Miami, 2017.
- Balachandran S., Barber G.N. Defective translational control facilitates vesicular stomatitis virus oncolysis. *Cancer Cell* 2004;5:51–65.
- Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hygiene* 1938;27:493–7.
- Lipatova A.V., Le T.H., Sosnovtseva A.O. et al. Relationship between cell receptors and tumor cell sensitivity to oncolytic enteroviruses. *Bull Exp Biol Med* 2018;166(1):58–62. DOI: 10.1007/s10517-018-4289-1.
- Soboleva A.V., Seryak D.A., Gabdrakhmanova A.F. et al. Glioblastoma Multiforme stem cells are highly sensitive

- to some human non-pathogenic enteroviruses. *J Pharm Sci Res* 2018;10(4):936–9.
19. Sidorenko A.S., Zheltukhin A.O., Le T.H. et al. Persistence of oncolytic coxsackie virus A7 in subcutaneous human glioblastoma xenografts in mice in the context of experimental therapy. *Bulletin of Russian State Medical University*, 2018. Pp. 41–46.
20. Soboleva A.V., Lipatova A.V., Kochetkov D.V., Chumakov P.M. Changes in the sensitivity of human glioblastoma cells to oncolytic enteroviruses induced by passaging. *Bulletin of Russian State Medical University*, 2018. Pp. 37–41.
21. Svyatchenko V.A., Ternovoy V.A., Kiselev N.N. et al. Bioselection of coxsackievirus B6 strain variants with altered tropism to human cancer cell lines. *Arch Virol* 2017;162(11):3355–62. DOI: 10.1007/s00705-017-3492-0.
22. Ohka S., Nihei C.I., Yamazaki M., Nomoto A. Poliovirus trafficking toward central nervous system via human poliovirus receptor-dependent and-independent pathway. *Front Microbiol* 2012;3:147–51. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00147.

Вклад авторов

Ф.Э. Бабаева: получение данных для анализа, анализ полученных данных (включая статистический), обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;

А.В. Липатова: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных (включая статистический), написание текста рукописи, получение статистических данных;

Д.В. Кочетков: проведение лабораторной части исследования, анализ полученных данных;

П.М. Чумаков: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста рукописи;

С.К. Кравченко: разработка дизайна исследования, написание текста рукописи.

Authors' contributions

F.E. Babaeva: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data (including statistical), reviewing of publications on the article's topic, article writing;

A.V. Lipatova: study design development, analysis of the obtained data (including statistical), article writing, obtaining statistical data;

D.V. Kochetkov: laboratory part of the study, analysis of the obtained data;

P.M. Chumakov: study design development, analysis of the obtained data, article writing;

S.K. Kravchenko: study design development, article writing.

ORCID авторов/ORCID of authors

Ф.Э. Бабаева/F.E. Babaeva: <https://orcid.org/0000-0002-5404-9024>

А.В. Липатова/A.V. Lipatova: <https://orcid.org/0000-0003-4501-8514>

П.М. Чумаков/P.M. Chumakov: <https://orcid.org/0000-0002-8078-2908>

С.К. Кравченко/S.K. Kravchenko: <https://orcid.org/0000-0002-7721-2074>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование поддержано грантом № 1.1096 Минздрава России, а также грантом № 075-15-2019-1660 Центра точного геномного редактирования и генетических технологий для биомедицины в рамках Федеральной программы развития генетических технологий в 2019–2027 гг.

Financing. The study was supported by the grant No 1.1096 from the Ministry of Health of Russia, and the grant No 075-15-2019-1660 to the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine under Federal Research Programme for Genetic Technologies Development for 2019–2027.

Статья поступила: 19.09.2019. Принята к публикации: 28.11.2019.

Article submitted: 19.09.2019. Accepted for publication: 28.11.2019.