

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ЛЕГОЧНОГО ФИБРОЗА У МЫШЕЙ, ИНДУЦИРОВАННАЯ ПОСРЕДСТВОМ АЭРОЗОЛЬНОЙ ДОСТАВКИ LPS

Намаканова О.А.^{1,2}, Губернаторова Е.О.^{1,2}, Чичерина Н.Р.³,
Зварцев Р.В.^{1,2}, Друзцкая М.С.^{1,2,3}

¹ ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

² Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

³ АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

Резюме. Повреждение легких, вызванное воздействием липополисахарида (LPS), является наиболее часто используемой моделью острого воспаления легочной ткани у мышей, что позволяет имитировать развитие синдрома респираторного расстройства у человека. Эффекты индуцированного экспериментального острого LPS-зависимого воспаления дыхательных путей хорошо изучены и связаны с накоплением нейтрофилов в бронхоальвеолярной жидкости (БАЛ), локальной и системной продукцией провоспалительных цитокинов, а также сужением просвета дыхательных путей. В последнее время появляется все больше исследований, показывающих наличие признаков легочного фиброза, таких как усиленная пролиферация фибробластов и избыточное отложение внеклеточного матрикса на поздних стадиях острого воспаления легких, вызванного воздействием LPS. В данной работе описана экспериментальная модель острого повреждения легких, индуцированная с помощью однократного аэрозольного введения LPS в качестве воспроизводимой *in vivo* модели легочного фиброза. Для этого мышей линии C57BL/6 помещали в камеру, и с помощью распылителя Aeroneb Lab Nebulizer подвергали воздействию аэрозоля, содержащего 10 мг LPS.

Было установлено, что через 5 недель после однократного ингаляционного введения LPS мыши демонстрировали повышенную продукцию IL-6 в БАЛ. Несмотря на то, что количество нейтрофилов не изменялось, на 5-й неделе после воздействия LPS происходило снижение процентного содержания альвеолярных макрофагов, что может свидетельствовать о продолжающемся локальном воспалении. В то же время доставка LPS с помощью аэрозольной установки, спустя несколько недель, приводило к увеличению продукции и экспрессии ключевых медиаторов фиброза, таких как повышенной продукции IL-10 в БАЛ, увеличенной экспрессии *Tgfb1*, *Col1a1*, *Il13* и *Acta2*, а также отложению коллагена в легочной ткани по сравнению с мышами с острым воспалением легких.

Адрес для переписки:

Намаканова Ольга Александровна
ФГБУН «Институт молекулярной биологии
имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук
119334, Россия, Москва, ул. Вавилова, 32.
Тел.: 8 (902) 520-24-99.
e-mail: olga.namakanova@gmail.com

Address for correspondence:

Olga A. Namakanova
Engelhardt Institute of Molecular Biology
32 Vavilov St
Moscow
119334 Russian Federation
Phone: +7 (902) 520-24-99.
E-mail: olga.namakanova@gmail.com

Образец цитирования:

О.А. Намаканова, Е.О. Губернаторова, Н.Р. Чичерина,
Р.В. Зварцев, М.С. Друзцкая «Экспериментальная
модель легочного фиброза у мышей, индуцированная
средством аэрозольной доставки LPS» // Российский
иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 145-150.
doi: 10.46235/1028-7221-16876-EMM

© Намаканова О.А. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.A. Namakanova, E.O. Gubernatorova, N.R. Chicherina,
R.V. Zvartsev, M.S. Drutskaya "Experimental mouse model of
pulmonary fibrosis induced by nebulized LPS administration",
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 145-150.
doi: 10.46235/1028-7221-16876-EMM

© Namakanova O.A. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16876-EMM

Таким образом, использование метода однократного введения LPS с помощью небулайзера представляет собой релевантную, воспроизводимую и физиологичную модель на мышах, что в дальнейшем позволит исследовать механизмы развития фиброза легких и поможет в поиске новых терапевтических средств и подходов.

Ключевые слова: цитокины, фиброз легких, LPS, мышинная модель воспаления легких

EXPERIMENTAL MOUSE MODEL OF PULMONARY FIBROSIS INDUCED BY NEBULIZED LPS ADMINISTRATION

Namakanova O.A.^{a, b}, Gubernatorova E.O.^{a, b}, Chicherina N.R.^c,
Zvartsev R.V.^{a, b}, Drutskaya M.S.^{a, b, c}

^a Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^c Sirius University of Science and Technology, Krasnodar Region, Russian Federation

Abstract. Lipopolysaccharide (LPS)-induced lung injury is the most commonly used mouse model of acute lung inflammation that simulates the development of respiratory distress syndrome in humans. The effects of acute LPS-induced airway inflammation are well studied and associated with the neutrophil accumulation in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), local and systemic production of proinflammatory cytokines and narrowing of the airways. Recent studies demonstrated the presence of pulmonary fibrosis characterized by increased fibroblast proliferation and excess extracellular matrix deposition in late phase of acute lung inflammation caused by LPS exposure. This work describes an experimental model of acute lung injury induced by a single aerosol injection of LPS as a reproducible *in vivo* model of pulmonary fibrosis. To induce lung injury, C57BL/6 mice were placed in a chamber and exposed to an aerosol containing 10 mg of LPS using an Aeronex Lab Nebulizer delivery system. We found that 5 weeks after a single nebulized LPS administration, mice have increased production of IL-6 in BALF. Although the frequency of neutrophils was not altered, there was a decrease in the percentage of alveolar macrophages at 5 weeks after LPS exposure, indicating continued lung inflammation. Several weeks after aerosolized LPS challenge, IL-10 production in BALF was increased, as well as expression of *Tgfb1*, *Colla1*, *Il13* and *Acta2*, and collagen deposition in lung tissue compared to mice with acute lung inflammation.

Thus, the single nebulized LPS administration represents a relevant, reproducible and physiologic model in mice allowing to investigate the mechanisms of pulmonary fibrosis development and help in the search for new therapeutic agents and approaches.

Keywords: cytokines, pulmonary fibrosis, LPS, mouse model of lung inflammation

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-75-30032).

Введение

Воспаление, экспериментально индуцированное в ответ на LPS, основного иммуногенного компонента стенки грамотрицательных бактерий, используется для изучения молекулярных механизмов протекающих реакций и служит упрощенной моделью острого повреждения легких. У мышей краткосрочные эффекты, наблюдаемые на фоне острого LPS-индуцированного воспаления легких, хорошо изучены, в то время как долговременные изменения недостаточно исследованы. Так, в одном исследовании было

показано, что однократное введение LPS в виде аэрозоля приводит к воспалению дыхательных путей и ремоделированию легочной ткани с отложением коллагена через несколько недель [3]. Известно, что развитие легочного фиброза является последствием перенесенного острого и не разрешившегося в течение длительного времени воспаления легких [9]. Таким образом, поиск релевантной мышинной модели для понимания механизмов, лежащих в основе перехода от острого воспаления к фиброзу легких, остается весьма актуальной задачей.

Модель LPS-индуцированного воспаления легких с помощью аэрозоля лучше имитирует физиологичный процесс заражения воздушно-капельным путем. Однако, несмотря на преиму-

шества этой модели, к которым относятся неинвазивность метода, способность одновременно индуцировать заболевание у большого количества животных, а также равномерное осаждение частиц с LPS по поверхности дыхательных путей, существует и ряд недостатков. Так, одним из ограничений модели является то, что слизистые других органов могут также подвергаться воздействию бактериальных компонентов, что может вызывать нежелательные системные воспалительные реакции [6]. В связи с этим возникает потребность в разработке улучшенной экспериментальной модели, заключающейся, например, в использовании более низкой дозы LPS для снижения потенциальных побочных эффектов.

В настоящей работе была оптимизирована ранее опубликованная модель воспаления легких, а также продемонстрированы наличие признаков легочного фиброза на более поздних стадиях как следствие острого повреждения легких, индуцированного путем однократного ингаляционного введения LPS.

Материалы и методы

Мыши

Мышей линии C57BL/6 в возрасте 6-9 недель содержали на базе Автономного экспериментально-биологического комплекса для временного размещения и исследования генетически модифицированных линий лабораторных мышей категории SPF при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1660). Все манипуляции с животными были выполнены в соответствии протоколом, утвержденным Комиссией по биоэтике ИМБ РАН (Протокол № 1 от 04.03.2024).

LPS-индуцированное воспаление легких

Острое воспаление легких у мышей индуцировали посредством введения LPS по ранее опубликованному протоколу с небольшими из-

менениями [3]. Мышей подвергали воздействию LPS с использованием пассивной ингаляционной установки с камерой (Aeroneb Lab Nebulizer, Kent Scientific Corporation). Индукцию острого воспаления дыхательных путей осуществляли посредством однократного ингаляционного введения 5 мл LPS в концентрации 2 мг/мл (LPS из *E. coli* 0111: B4, Sigma-Aldrich, США) до полного распыления раствора, а также 5 мл физраствора в качестве контроля (рис. 1А, см. 2-ю стр. обложки). В эксперименте участвовало три группы мышей: контрольная группа (через 24 ч после введения физраствора); группа мышей для определения кратковременных эффектов (через 24 ч после введения LPS); а также группа мышей для оценки развития фиброза (через 5 недель после введения LPS).

Цитофлуориметрический анализ

Для блокировки неспецифического связывания клетки окрашивали антителами к FcγR, используя анти-CD16/CD32 антитела, в течение 20 мин при 4 °С с последующим окрашиванием антителами к поверхностным маркерам: анти-CD45 (30-F11), анти-SiglecF (E50-2440), анти-CD11c (N418), анти-CD11b (M1/70), анти-Ly6G (1A8) в течение 20 мин при 4 °С. Для исключения мертвых клеток использовали Fixable ViabilityDye. Анализ проводили с помощью проточного цитометра FACSCanto II (BD Biosciences, США) и программного обеспечения FlowJo v. 10.

Измерение продукции TNF, IL-6 и IL-10

Цитокины в БАЛ анализировали методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов Mouse TNFalpha, IL-6, IL-10 ELISA Ready-SET-Go (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу производителя.

Измерение экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени

РНК образцов легких подвергали обратной транскрипции для синтеза кДНК с использова-

ТАБЛИЦА 1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПРАЙМЕРОВ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ДЛЯ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

TABLE 1. NUCLEOTIDE SEQUENCES OF PRIMERS USED FOR qRT-PCR ANALYSIS

Ген Gene	Последовательность Sequence	
	Прямая Forward	Обратная Reverse
<i>Actb</i>	CTCCTGAGCGCAAGTACTCTGTG	TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC
<i>Tgfb1</i>	CAACAATTCCTGGCGTTACCT	GGCTGATCCCGTTGATTTCC
<i>Il13</i>	CCTGGCTCTTGCTTGCCTT	GGTCTTGTGTGATGTTGCTCA
<i>Col1a1</i>	ACGCCATCAAGGTCTACTG	GTAICTCGAACGGGAATCCA
<i>Acta2</i>	GGCACCACCTTTCTATAACGAG	GCACAATACCAGTTGTACGTCC

нием набора для синтеза кДНК RevertAid First Strand (Thermo Fisher Scientific, США). Изменение экспрессии генов проводили с использованием qPCRmix-HS SYBR (ЗАО «Евроген», Россия). Анализ экспрессии генов проводили с использованием 7500 Real Time PCR System Amplificator (Applied Biosystems, США) и следующего набора праймеров (табл. 1). Для определения относительной экспрессии генов применяли сравнительный метод $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [8].

Гистологический анализ срезов легких

Образцы легочной ткани фиксировали в 4%-ном формальдегиде, заключали в парафин и с помощью микротомы SLEE CUT 4055 делали срезы толщиной 5 мкм с последующим окрашиванием по Массону, используя стандартный протокол производителя (ООО «БиоВитрум», Россия). Анализ срезов проводили на конфокальном микроскопе Zeiss LSM 980.

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов проводили в программе GraphPad Prism 9 при помощи теста one-way ANOVA. Различия считали достоверными при * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns (non-significant) – нет разницы.

Результаты и обсуждение

LPS-индуцированное повреждение легких является одной из широко применяемых и хорошо воспроизводимых моделей острого воспаления, которое используется для изучения молекулярных и клеточных механизмов патогенеза заболевания и поиска оптимальных терапевтических подходов. При этом большая часть исследований посвящена изучению повреждений легких на острой фазе, в то время как работы по оценке долговременных изменений в легочной ткани встречаются крайне редко. В нашей работе используется модель острого воспаления дыхательных путей посредством однократного ингаляционного введения LPS (рис. 1А, см. 2-ю стр. обложки). Предложенная модель позволяет оценить наличие как кратковременных изменений, наблюдаемых во время острой фазы, так и долгосрочных последствий в ответ на LPS, характерных для фибропролиферативной фазы, во время которой развивается хроническое воспаление и фиброз. Так, ингаляционное введение LPS спустя сутки приводило к значительной инфильтрации нейтрофилов в БАЛ, что характерно для острой фазы воспаления, в то время как на 5-й неделе после воздействия LPS содержание нейтрофилов снижалось до уровня, характерного для наивного состояния (рис. 1Б, см. 2-ю стр. обложки). В то же время процентное содержание эозинофилов

через 24 ч и 5 недель после введения LPS не изменялось (рис. 1Б, см. 2-ю стр. обложки). Известно, что острое воспаление дыхательных путей приводит к достоверной деплеции резидентных SiglecF⁺CD11c⁺ альвеолярных макрофагов [1]. Действительно, у мышей на фоне острого воспаления наблюдалось резкое снижение процентного содержания альвеолярных макрофагов в БАЛ по сравнению с контрольной группой (рис. 1Б, см. 2-ю стр. обложки). В то же время мыши на 5-й неделе после введения LPS демонстрировали повышенное процентное содержание альвеолярных макрофагов по сравнению с группой мышей через 24 ч после ингаляционного введения LPS (рис. 1Б, см. 2-ю стр. обложки). При этом на 5-й неделе не происходило восстановления пула альвеолярных макрофагов, сравнимого с контрольной группой, что может свидетельствовать о продолжающемся воспалении дыхательных путей при фибропролиферативной фазе (рис. 1Б, см. 2-ю стр. обложки). Кроме того, через 5 недель после введения LPS наблюдалось локальное увеличение продукции IL-6, но не TNF в БАЛ (рис. 1В, см. 2-ю стр. обложки). При этом продукция TNF и IL-6 в БАЛ между группами мышей через 24 ч после ингаляционного введения LPS и контрольной группой была статистически значимой (рис. 1В, см. 2-ю стр. обложки). Таким образом, в качестве долговременных изменений в легких, спустя 5 недель после однократного аэрозольного введения LPS, наблюдался повышенный уровень продукции IL-6 и нарушенное восполнение пула альвеолярных макрофагов в БАЛ, что свидетельствует о хроническом характере воспаления.

Известно, что IL-10, будучи каноническим противовоспалительным цитокином, снижает выработку провоспалительных цитокинов, тем самым ингибируя воспаление. При этом имеются данные о вкладе IL-10 в возникновение и развитие фиброза легких. Так, у пациентов с идиопатическим легочным фиброзом обнаружен высокий уровень продукции IL-10 в БАЛ, а мыши с полным удалением IL-10 не развивали фиброз, индуцированный диоксидом кремния или блеомицином [2, 7]. Нами было показано, что кратковременное ингаляционное введение LPS спустя 5 недель, но не через 24 ч приводит к повышенной продукции IL-10 в БАЛ (рис. 2А, см. 3-ю стр. обложки). Другой важный медиатор воспаления легких, TGF- β (трансформирующий фактор роста β), способствует выработке коллагена в легочной ткани, а также активирует дифференцировку фибробластов [4]. Было установлено, что однократное воздействие LPS в виде аэрозоля значительно увеличивало экспрессию

Tgfb1 и *Colla1* в легких у мышей через 5 недель по сравнению с контрольной группой и мышами с острым воспалением (рис. 2Б, см. 3-ю стр. обложки). Повышенная экспрессия *Tgfb1* в легких коррелировала с локальной повышенной продукцией ИЛ-6 (рис. 1В, 2Б, см. 3-ю стр. обложки), что подтверждает значимость ИЛ-6-индуцированной экспрессии TGF- β в трансдифференцировке фибробластов в миофибробласты [10]. Важно отметить, что TGF- β также может дифференцировать фибробласты в миофибробласты путем индукции экспрессии α -SMA (гладкомышечный актин α), кодирующегося геном *Acta2*, в то время как ИЛ-13 напрямую регулирует продукцию коллагена и α -SMA в фибробластах [5]. В соответствии с этими ранее опубликованными результатами, в легких мышей через 5 недель после воздействия LPS наблюдалась повышенная экспрессия как *Il13*, так и *Acta2* в сравнении с другими группами (рис. 2Б, см. 3-ю стр. обложки). При этом окрашивание образцов ткани легкого по Массону выявило отложение коллагена (интенсивное синее окрашивание) в легочной ткани у мышей через 5 недель после аэрозольного введения LPS (рис. 2В, см. 3-ю стр. обложки), что коррелировало с повышенной экспрессией *Colla1* в легких мышей спустя 5 недель (рис. 2Б, см. 3-ю стр. обложки). Важно отметить, что в используемой модели наблюдалось незначительное отложение коллагена, что может свидетельствовать лишь

о начальной стадии фиброза. Предположительно, накопление большого количества коллагена требует более 5 недель после воздействия LPS. Суммируя вышеописанные результаты, было показано, что однократное ингаляционное введение LPS приводит спустя 5 недель к появлению типичных признаков фиброза легких, таких как увеличение продукции ИЛ-10 и экспрессии медиаторов фиброза, таких как *Tgfb1*, *Colla1*, *Il13*, *Acta2*, наряду с отложением коллагеновых волокон в легочной ткани.

Заключение

В работе показано, что однократное введение LPS в виде аэрозоля, используя ингаляционную установку Aeroneb Lab Nebulizer с камерой, приводит к развитию хронического воспаления, а также появлению типичных признаков фиброза, проявляющиеся в повышенной продукции ИЛ-10 в БАЛ, экспрессии *Tgfb1*, *Colla1*, *Il13*, *Acta2* и накоплении коллагена в легких. Использование небулайзера как ингаляционной формы доставки LPS представляет собой более физиологичную экспериментальную модель по сравнению с интраназальным введением, что позволит в будущем изучить механизмы развития фиброза на поздних стадиях острого повреждения легких и оптимизировать существующие терапевтические подходы.

Список литературы / References

1. Bain C.C., MacDonald A.S. The impact of the lung environment on macrophage development, activation and function: diversity in the face of adversity. *Mucosal Immunol.*, 2022, Vol. 15, no. 2, pp. 223-234.
2. Byrne A.J., Maher T.M., Lloyd C.M. Pulmonary macrophages: a new therapeutic pathway in fibrosing lung disease? *Trends Mol. Med.*, 2016, Vol. 22, no. 4, pp 303-316.
3. de Souza Xavier Costa N., Ribeiro Junior G., Dos Santos Alemany A.A., Belotti L., Zati D.H., Frota Cavalcante M., Matera Veras M., Ribeiro S., Kallas E.G., Nascimento Saldiva P.H., Dolhnikoff M., Ferraz da Silva L.F. Early and late pulmonary effects of nebulized LPS in mice: An acute lung injury model. *PLoS One*, 2017, Vol. 12, no. 9, e0185474. doi: 10.1371/journal.pone.0185474.
4. Frangogiannis N. Transforming growth factor-beta in tissue fibrosis. *J. Exp. Med.*, 2020, Vol. 217, no. 3, e20190103. doi: 10.1084/jem.20190103.
5. Kolahian S., Fernandez I.E., Eickelberg O., Hartl D. Immune mechanisms in pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2016, Vol. 55, no. 3, pp. 309-322.
6. Mizgerd J.P., Skerrett S.J. Animal models of human pneumonia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2008, Vol. 294, no. 3, pp. L387-L398.
7. Nakagome K., Dohi M., Okunishi K., Tanaka R., Miyazaki J., Yamamoto K. *In vivo* IL-10 gene delivery attenuates bleomycin induced pulmonary fibrosis by inhibiting the production and activation of TGF-beta in the lung. *Thorax*, 2006, Vol. 61, no. 10, pp. 886-894.
8. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.*, 2008, Vol. 3, no. 6, pp. 1101-1108.

9. Tsikis S.T., Fligor S.C., Hirsch T.I., Pan A., Yu L.J., Kishikawa H., Joiner M.M., Mitchell P.D., Puder M. Lipopolysaccharide-induced murine lung injury results in long-term pulmonary changes and downregulation of angiogenic pathways. *Sci. Rep.*, 2022, Vol. 12, no. 1, 10245. doi: 10.1038/s41598-022-14618-8.

10. Zheng M., Li H., Sun L., Brigstock D.R., Gao R. Interleukin-6 participates in human pancreatic stellate cell activation and collagen I production via TGF-beta1/Smad pathway. *Cytokine*, 2021, Vol. 143, 155536. doi: 10.1016/j.cyto.2021.155536.

Авторы:

Намаканова О.А. — младший научный сотрудник Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Губернаторова Е.О. — старший научный сотрудник Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Чичерина Н.Р. — студент, магистр направления «Иммунобиология и биомедицина», АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

Зварцев Р.В. — младший научный сотрудник Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Друцкая М.С. — д.б.н., ведущий научный сотрудник Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва; доцент, АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

Authors:

Namakanova O.A., Junior Research Associate, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Gubernatorova E.O., Senior Research Associate, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Chicherina N.R., Master Student, Division of Immunobiology and Biomedicine, Sirius University of Science and Technology, Krasnodar Region, Russian Federation

Zvartsev R.V., Junior Research Associate, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Drutskaya M.S., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow; Associate Professor, Sirius University of Science and Technology, Krasnodar Region, Russian Federation