

УДК 576.3.085.23:611.018.23

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-75–82

Для цитирования: Кулакова К.В., Алейник Д.Я., Чарыкова И.Н. Совместное использование разработанных коллагеносодержащих комплексов и культуры клеток для создания новых тканевых эквивалентов. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (5): 75–82

## Совместное использование разработанных коллагеносодержащих комплексов и культуры клеток для создания новых тканевых эквивалентов

Кулакова К.В., Алейник Д.Я., Чарыкова И.Н.

Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр (ПФМИЦ)  
Россия, 603155, г. Нижний Новгород, Верхне-Волжская Набережная, 18

### РЕЗЮМЕ

**Цель исследования** – оценка возможности применения созданного комплексного модуля в качестве основы клеточно-тканевого эквивалента для лечения ран кожи и мягких тканей. В рамках поставленной цели решались задачи по изучению пространственной структуры и архитектоники поверхности разработанных базовых коллагеносодержащих материалов и их биосовместимости с клеточными культурами.

**Материал и методы.** Проведено исследование материала, который представляет собой двухслойный пленочный комплекс, состоящий из коллагенового и полисахаридного компонентов. Коллаген выделялся из дермы и был импрегнирован мелкодисперсным деминерализованным костным матриксом (ДКМ) по оригинальной методике. Для исследования дегидратированный материал был выполнен в виде пленки. Электронно-микроскопическое исследование поверхности проведено на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-IT300LV (Япония) в режиме высокого вакуума и при низких значениях тока зонда ( $< 0,1$  нА). Исследования по оценке жизнеспособности клеток в условиях культивирования на пленках из коллагеносодержащего материала (тестирование на цитотоксичность и адгезивную способность) проводили *in vitro* с использованием штаммов диплоидных фибробластов человека 4–6-го пассажа. Состояние культуры оценивали визуально с помощью инвертированного микроскопа Leica DM (Carl Zeiss, Австрия), оснащенного компьютерной программой контроля роста культуры (Leica IM 1000).

**Результаты.** Данные, полученные при изучении структуры поверхности разработанного комплексного модуля, показали, что он представляется перспективным в качестве базового компонента клеточно-тканевой системы: наличие большого количества структурных образований для фиксации клеток и хорошо организованного барьерного слоя, способного к паро- и водонепроницаемости. Таким образом, экспериментально подтверждено соответствие физических характеристик разработанного базового комплекса требованиям, предъявляемым к материалам для культивирования клеток. Показано отсутствие цитотоксичности на модели культуры дермальных фибробластов человека, что позволяет сделать вывод о возможности его использования в качестве основы клеточно-тканевого эквивалента. Полученные предварительные результаты указывают на целесообразность дальнейшего проведения экспериментов *in vivo*, направленных на совершенствование комплексных коллагеносодержащих материалов, разработку различных способов их применения и клиническую оценку эффективности при лечении ран различного генеза.

**Ключевые слова:** коллаген, регенерация, тканевая инженерия, клеточная культура, фибробласты.

✉ Кулакова Ксения Владимировна, e-mail: kulakova-k@yandex.ru

## ВВЕДЕНИЕ

Восстановление структуры и функций поврежденных тканей на основе использования клеточных технологий и тканевой инженерии представляет собой перспективное направление регенеративной медицины. Для создания комбинированных заменителей соединительной ткани широко используется коллаген, выделяемый из различных источников. Он может применяться в различных формах и многообразных сочетаниях с лекарственными препаратами и культурами клеток в соответствии с конкретными клиническими задачами [1]. Разработка материалов, обеспечивающих структурообразующую и транспортную функции в системе «клетка – субстрат», изучение взаимодействия клеток и носителей для их культивирования представляют первоочередную задачу [2–5]. В рамках ее решения важным этапом является формирование трехмерных биодеградируемых матриц, способствующих регенерации окружающей ткани. В отделении консервации тканей ПФМИЦ (г. Нижний Новгород) разработан оригинальный метод выделения коллагена из ксеногенной дермы [6, 7] и на его основе создана гетерогенная матрица, в основу которой положен модульный принцип. Результаты исследования физико-механических свойств пленочных модификаций на разрывной машине марки Zwick 5 (Zwick GmbH. and Co., Германия) указывают на пригодность материала для создания на его основе клеточно-тканевого комплекса [8].

Цель представленного исследования – оценка возможности создания на основе разработанного базового модуля клеточно-тканевого эквивалента для лечения ран кожи и мягких тканей. В рамках поставленной цели решались задачи по изучению пространственной структуры и архитектоники поверхности новых коллагенсодержащих материалов, а также их биосовместимости с клеточными культурами.

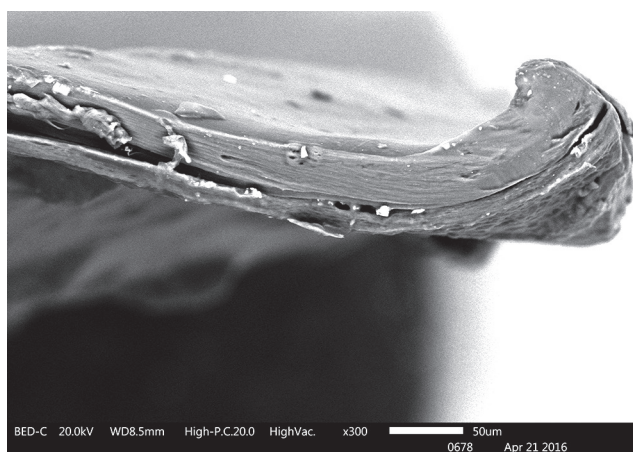
## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Запатентованный материал представляет собой двухслойный пленочный комплекс, состоящий из коллагенового и полисахаридного компонентов [9]. Существует возможность модифицирования продукта в зависимости от технологических условий его изготовления и дополнения компонентами, актуальными в условиях проводимого эксперимента, либо конкретной клинической ситуации. Коллагеновый слой покрытия может быть импрегнирован мелкодисперсным деминерализованным костным матриксом (ДКМ), содержащим

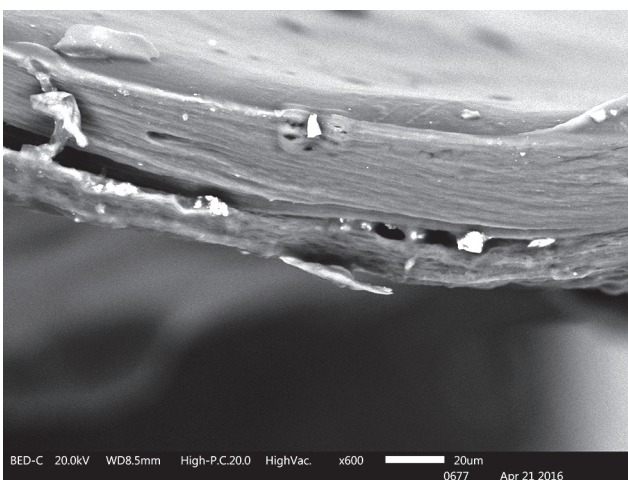
комплекс тканевых факторов роста [10–12]. Дегидратированный материал в виде пленки либо гель-пленки представляет собой раневое покрытие, выполненное с учетом современных требований, способное оптимизировать раневой процесс и значительно сокращать сроки эпителизации ран кожи [13]. Кроме того, в таком виде материал представляет собой основу для получения клеточно-тканевого комплекса. Выбор компонентов обусловлен их способностью активно влиять на регенеративный процесс и оптимизировать условия для его протекания. Аморфный коллаген III типа выполняет функцию депо аминокислот для построения собственных коллагеновых волокон фибробластами. ДКМ представляет собой структурированный коллаген I типа с сохраненной архитектоникой и в силу этого может служить эффективным носителем различных биологически активных веществ, обеспечивать необходимые особенности микрорельефа поверхности для прикрепления клеток и интенсифицировать их миграцию в область поражения из подлежащих тканей. Полисахаридный слой изолирует раневую поверхность от внешней среды и обеспечивает покрытие необходимые физические свойства: прочность, эластичность, адгезивные и адсорбционные свойства, проницаемость для жидкости и газов [14]. Электронно-микроскопическое исследование поверхности разработанного пленочного материала было выполнено на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-IT300LV (Япония) в режиме высокого вакуума и при низких значениях тока зонда ( $< 0,1$  нА), чтобы уменьшить воздействие электронного пучка на исследуемые образцы; диаметр электронного зонда до 3 нм. Оценка цитотоксичности созданного материала проведена в соответствии со следующим протоколом. В качестве тестовой культуры использованы три штамма диплоидных фибробластов человека 4–6-го пассажа (культура стерильна, микоплазмами и вирусами не контаминирована). Исходная концентрация:  $2 \times 10^5$  кл/см<sup>3</sup>. Контрольные точки исследования после пересева: 24 ч, 48, 72 ч. Условия культивирования: 37 °С, абсолютная влажность, 5% CO<sub>2</sub>, культуральные чашки Петри диаметром 35 мм (Corning, USA). Ростовая среда: DMEM (Sigma, США), 7–10%-я телячья эмбриональная сыворотка, 2%-й L-глутамин, антибиотики (100 ЕД/мл пенициллина, 0,1 мкг стрептомицина). Состояние культуры оценивали визуально с помощью инвертированного микроскопа Leica DM IL (Carl Zeiss, Австрия), оснащенного компьютерной программой контроля роста культуры (Leica IM 1000).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования поверхности пленочного материала показали следующие особенности характера структуры объекта: наличие двух разновеликих слоев, ДКМ занимает преимущественно пограничное положение, его частицы образуют хорошо различимые агломераты, размеры которых варьируют в широких пределах. На электронно-микроскопическом изображении среза исследуемого материала (рис. 1) видны вышеупомянутые слои пленки. Полисахаридный слой основы для тканевой конструкции по сравнению с коллагеновым слоем представляется более мощным, толщина его составляет 30 мкм, в то время как толщина коллагенового — 14 мкм. Поскольку полисахаридный слой обеспечивает функции адсорбции, водо-, газопроницаемости и отграничения раневой поверхности от внешней среды, такое взаимоотношение толщин слоев представляется обоснованным.



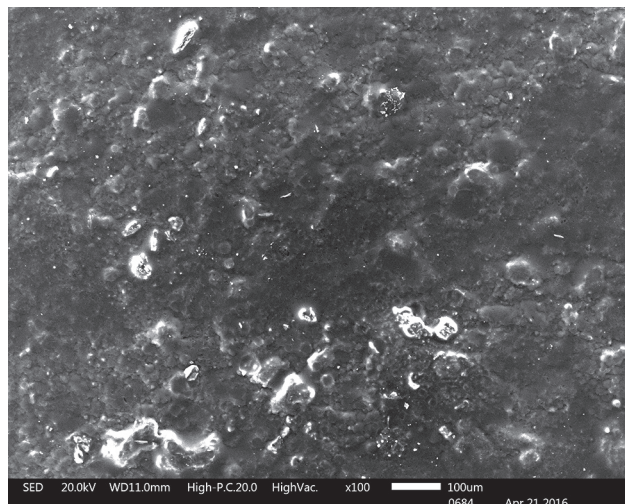
*a*



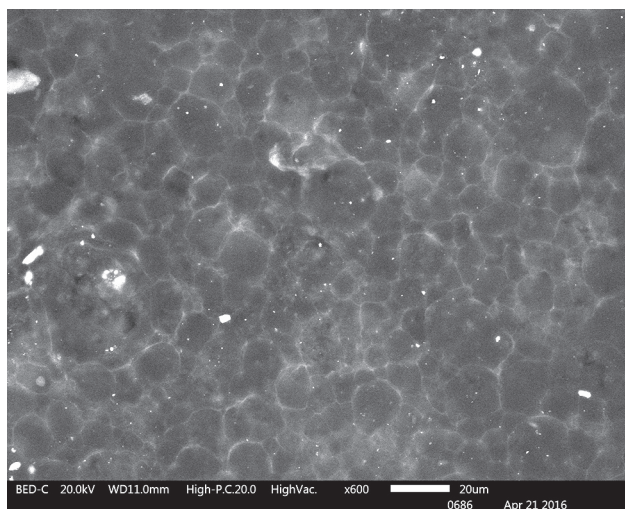
*б*

Рис. 1. Поперечный срез двухслойного коллагеново-полисахаридного материала с деминерализованным костным матриксом: *a* – ув. 300; *б* – ув. 600

Детальный анализ структуры коллагенового слоя подтвердил предположение, что она содержит большое количество полостей и локусов для фиксации клеток. Элементы ДКМ образуют объемные неоднородные включения в массе волокнистого фибриллярного коллагенового слоя (рис. 2).



*a*



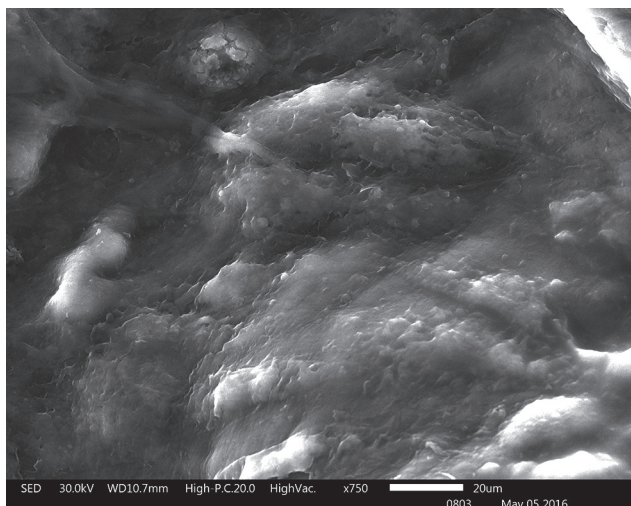
*б*

Рис. 2. Поверхность коллагенового слоя с деминерализованным костным матриксом. Виден хорошо организованный слой коллагена, в котором просматриваются включения деминерализованного костного матрикса: *a* – ув. 100; *б* – ув. 600

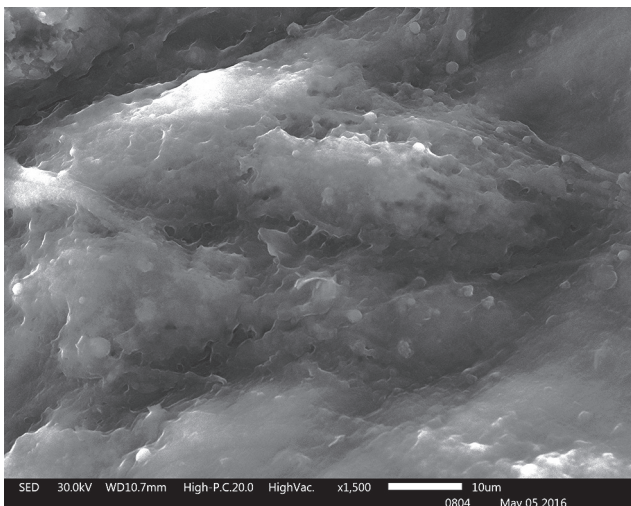
Анализ структуры поверхности коллагенового слоя материала после контакта с ростовой средой показал наличие процессов набухания, миграции частиц ДКМ из объема материала на поверхность коллагенового слоя, увеличивающей таким образом ее суммарную площадь.

Из-за большого разнообразия условий протекания раневых процессов, в ходе которых

возможны как активная экссудация из полости раны, так и отсутствие раневого отделяемого с риском образования струпа, наблюдаемая возможность миграции активных элементов в объеме созданного материала может быть эффективной.



а

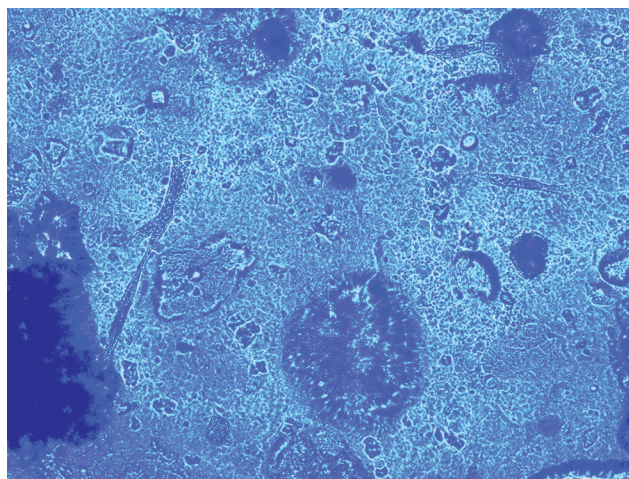


б

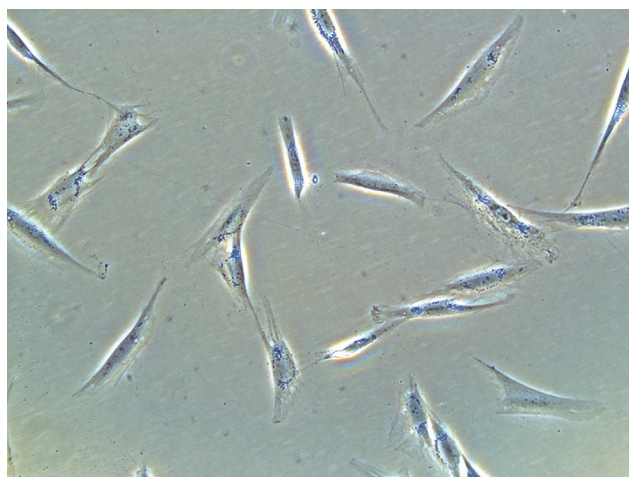
Рис. 3. Поверхность коллагенового слоя с деминерализованным костным матриксом после 24 ч контакта со средой культивирования клеток: а – ув. 750; б – ув. 1500

Таким образом, данные, полученные при изучении структуры поверхности разработанного материала, показали, что он представляется перспективным в качестве базового модуля для клеточно-тканевой системы и последующего создания на его основе тканевого эквивалента (рис. 3). При проведении исследования *in vitro* по оценке жизнеспособности фибробластов в условиях культивирования на пленках из разработанного коллагенсодержащего материала (тестирование на цитотоксичность и адгезивную способность)

установлено, что он не является токсичным для культуры дермальных фибробластов человека: не наблюдалась выраженная гибель клеток на приготовленных из него подложках; отмечались рост культуры в течение всего времени эксперимента и отсутствие клеточного дебриса в среде. Наблюдалось распластывание клеток по поверхности пленок с формированием характерного рисунка монослоя, что указывало на наличие адгезии клеток, их активный рост и пролиферацию на поверхности исследуемого материала. Через 24 ч после пересева отмечали распластывание единичных клеток как на поверхности коллагенсодержащей пленки-подложки (рис. 4, а), так и на культуральном пластике под пленкой (рис. 4, б).



а



б

Рис. 4. Фибробласты: а – на исследуемом коллагенсодержащем носителе, ув. 200, окраска азур-эозином, 24 ч культивирования. Видны включения деминерализованного костного матрикса и единичные фибробласты; б – на поверхности культурального пластика после удаления исследуемого коллагенсодержащего носителя, 24 ч культивирования, ув. 100, фазовый контраст

Через 48 ч после посева на поверхности пленки наблюдался рост клеток разной конфлюентности: от частой сеточки до монослоя. Фи-

бробласты имели треугольную и веретеновидную форму, с выраженными отростками, четкими ядрами (рис. 5).

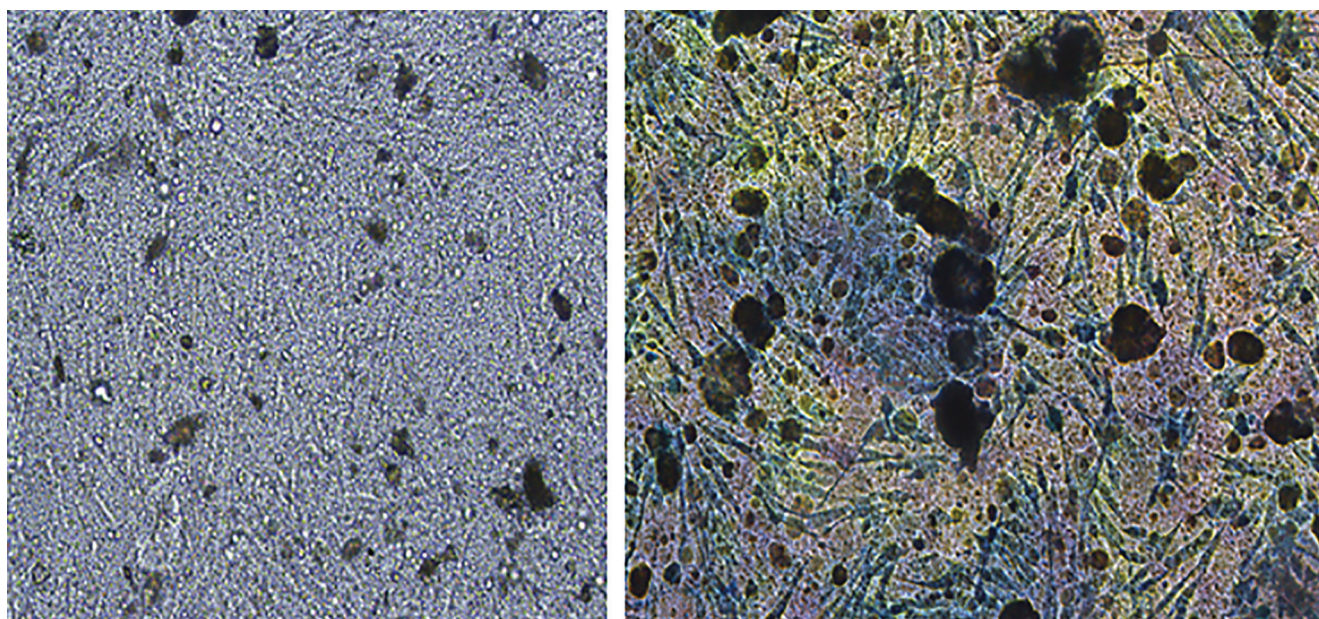


Рис. 5. Фибробласты на исследуемом коллагенсодержащем носителе, ув. 100: слева – нативный препарат, справа – окраска по Романовскому, 2-е сут культивирования. Видны включения деминерализованного костного матрикса

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, подтверждено экспериментально, что физические характеристики разработанного материала соответствуют требованиям, предъявляемым к материалу для культивирования клеток. Кроме того показано, что материал не является токсичным для культуры дермальных фибробластов человека, что позволяет сделать вывод о его пригодности для создания на его основе клеточно-тканевого комплекса и проведения экспериментальных исследований *in vivo*. Исходя из полученных результатов, представляется целесообразным дальнейшее совершенствование коллагенсодержащего комплекса и различных способов его применения для лечения ран кожи и мягких тканей, а также продолжение исследований, направленных на оценку его эффективности в эксперименте и клинике.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Электронно-микроскопические исследования разработанных материалов были выполнены в Центре коллективного пользования «Новые материалы и ресурсосберегающие технологии» ННГУ им Н.И. Лобачевского г. Нижнего Новгорода. Авторы выражают глубокую признательность и благодарность директору Центра, д-ру хим. наук, профессору Е.В. Сулейманову за предоставленный доступ к оборудованию и возможность проведения соответствующих исследований и научному сотруднику Центра, канд. физ.-мат. наук А.В. Борякову за проведенные исследования. За поддержку и бесценные консультации при подготовке статьи авторы выражают благодарность П.Е. Анфимову.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев М.П. Коллагеновые нити, волокнистые и пленочные материалы. Санкт-Петербург: СПГУТД, 2004: 397.
2. Shahrokhi S., Arno A., Jeschke M.G. The use of dermal substitutes in burn surgery: acute phase // *Wound Repair. Regen.* 2014; 22 (1): 14–22.
3. Han S.K., Yoon T.H., Lee D.G., Lee M.A., Kim W.K. Potential of human bone marrow stromal cells to accelerate

- wound healing in vitro // *Ann. Plast. Surg.* 2005; 55 (4): 414–419.
4. Liu P., Deng Z., Han S., Liu T., Wen N., Lu W., Geng X., Huang S., Jin Y. Tissue-engineered skin containing mesenchymal stem cells improves burn wounds // *Artif. Organs.* 2008; 32 (12): 925–931. doi:10.1111/j.1525-1594.2008.00654.x
  5. Laverdet B., Micallef L., Lebreton C., Mollard J., Lataillade J.J., Coulomb B., Desmouliere A. Use of mesenchymal stem cells for cutaneous repair and skin substitute elaboration. // *Pathologie Biologie.* 2014; 62 (2): 108–117. doi: 10.1016/j.patbio.2014.01.002. Epub 2014 Mar 21. Review. PMID: 24661975
  6. Анфимов П.Е., Краснова Н.С. Способ получения коллагена из биологического материала. Патент РФ 2322249. 20.04.2008.
  7. Денисов В.М., Бугров С.Н., Анфимов П.Е. Способ получения нейтрального коллагена из биологического материала. Патент РФ 2456810. 27.07.2012.
  8. Кулакова К.В., Бугров С.Н., Алейник Д.Я., Чарыкова И.Н., Сидорова Т.И., Стручков А.А. Клеточно-тканевые комплексы для восстановления дефектов кожного покрова // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2016; 4 (4): 703–706.
  9. Денисов В.М., Анфимов П.Е., Краснова Н.С., Куприянов В.А., Стручков А.А. Пленочное покрытие для ран. Патент РФ 2136318. 10.09.1999.
  10. Грязнухин Э.Г., Савельев В.И., Анисимова Л.О. Лечение ран под биологическим струпом из размельченной деминерализованной костной ткани // *Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантатов.* М., 1998: 60–62.
  11. Мовсарова З.М. Лечение ран с использованием размельченной деминерализованной костной ткани: автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб., 1998: 21 с.
  12. Greenholgh D. Role of growth factors in wound healing // *J. Trauma.* 1996; 41 (1): 159–167.
  13. Стручков А.А., Анфимов П.Е., Кулакова К.В., Бугров С.Н. Применение раневого покрытия «Биотекст» для местного лечения ожогов // *Вопросы травматологии и ортопедии.* 2012; 2: 16–17.
  14. Кулакова К.В., Бугров С.Н., Алейник Д.Я., Стручков А.А. Результаты применения разрабатываемых биологически активных материалов на основе коллагена для замещения тканевых дефектов в эксперименте // *Технологии живых систем.* 2013; 10 (8): 59–64.

Поступила в редакцию 05.09.2016

Утверждена к печати 01.12.20016

**Кулакова Ксения Владимировна**, канд. биол. наук, науч. сотрудник группы консервации тканей, Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр, г. Нижний Новгород.

**Алейник Диана Яковлевна**, ст. науч. сотрудник, руководитель группы биотехнологий, Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр, г. Нижний Новгород.

**Чарыкова Ирина Николаевна**, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории биотехнологий, Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр, г. Нижний Новгород.

✉ Кулакова Ксения Владимировна, e-mail: kulakova-k@yandex.ru

УДК 591.477.35:612.014.44:599.323.4

DOI 10.20538/1682-0363-2016-5-75–82

For citation: Kulakova K.V., Aleynik D.Ya., Charykova I.N. Joint use of developed collagen-containing complexes and cell cultures in creating new tissue equivalents. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2016; 15 (5): 75–82

## Joint use of developed collagen-containing complexes and cell cultures in creating new tissue equivalents

**Kulakova K.V., Aleynik D.Ya., Charykova I.N.**

*Privolzhsky Federal Research Medical Centre  
18, Verbne-Voljskaya Naberejnaya, Nizhny Novgorod, 603155, Russian Federation*

### ABSTRACT

The purpose of the study is to assess the possibility of applying the integrated module as the basis of a cell-tissue equivalent for treatment of wounds of skin and soft tissues. In the frame of the set task the following problems were being solved: research of the spatial structure and architectonics of the surface of the developed

base collagen-containing materials and their biocompatibility with cell cultures.

**Materials and methods.** The study of a material which is a two-layer complex film, consisting of collagen and polysaccharide components was carried out. The collagen was separated from the dermis and was then impregnated with particulate demineralized bone matrix (DCM) according to the original methodology. For the purposes of the study the dehydrated material was created in the form of a film. Electron microscopic examination of surfaces was performed on scanning electron microscope JEOL JSM-IT300LV in high vacuum and at low values of probe current ( $< 0,1$  nA). Studies to assess the viability of the cells cultivated on films of collagen material (tested for cytotoxicity and the adhesive capacity) were performed in vitro using strains of diploid human fibroblasts 4–6 passage. The culture condition was visually assessed using an inverted Leica microscope DM IL (Carl Zeiss, Austria), equipped with a computerized program of control of culture growth (Leica IM 1000).

**Results.** The data obtained in the study of the surface structure of the developed complex module showed that it seems to be promising as a basic component of the cellular-tissue system with its large number of structural formations for fixation of the cells and a well-organized barrier layer capable of vapor - permeability. Experiments in vitro confirmed the absence of toxicity of the material being studied in relation to the culture of dermal human fibroblasts, suggesting the possibility of creation on its basis of cell-tissue complex and further experimental studies in vivo.

**Conclusion.** Thus it was experimentally confirmed that the physical characteristics of the developed integrated module satisfy the requirements for the materials for cultivation of cells. The absence of cytotoxicity on the model of a culture of dermal human fibroblasts allows to make a conclusion about a possibility of its use as the basis of cell-tissue equivalent. Preliminary results indicate the advisability of further experiments in vivo aimed at improving complex collagen-containing materials, the development of different ways of their application and clinical evaluation of the effectiveness in the treatment of wounds of various genesis.

**Key words:** collagen, regeneration, tissue engineering, cell culture, fibroblasts.

## REFERENCES

- Vasiliev M.P. Kollagenovye niti, voloknistye i plenochnye materialy [Collagen filaments, fibrous and film materials]. SPGUTD Publ., 2010: 397 (in Russian).
- Shahrokhi S., Arno A., Jeschke M.G. The use of dermal substitutes in burn surgery: acute phase // *Wound Repair. Regen.* 2014; 22 (1): 14–22.
- Han S.K., Yoon T.H., Lee D.G., Lee M.A., Kim W.K. Potential of human bone marrow stromal cells to accelerate wound healing in vitro // *Ann. Plast. Surg.* 2005; 55 (4): 414–419.
- Liu P., Deng Z., Han S., Liu T., Wen N., Lu W., Geng X., Huang S., Jin Y. Tissue-engineered skin containing mesenchymal stem cells improves burn wounds // *Artif. Organs.* 2008; 32 (12): 925–931. doi:10.1111/j.1525-1594.2008.00654.x
- Laverdet B., Micallef L., Lebreton C., Mollard J., Lataillade J.J., Coulomb B., Desmouliere A. Use of mesenchymal stem cells for cutaneous repair and skin substitute elaboration. // *Pathologie Biologie.* 2014; 62 (2): 108–117. doi: 10.1016/j.patbio.2014.01.002. Epub 2014 Mar 21. Review. PMID: 24661975
- Anfimov P.E., Krasnova N.S. Sposob polucheniya kollagena iz biologicheskogo materiala [A method for producing collagen from biological material]. Patent RF – Russian patent 2322249, 2008 (in Russian).
- Denisov V.M., Bugrov S.N., Anfimov P.E. Sposob polucheniya neitral'nogo kollagena iz biologicheskogo materiala [A method for producing collagen from neutral biological material]. Patent RF – Russian patent 2456810, 2012 (in Russian).
- Kulakova K.V., Bugrov S.N., Aleynik D.Ya., Charykova I.N., Sidorova T.I., Struchkov A.A. Kletочно-тканевые комплексы для восстановления дефектов кожного покрова [Cellular tissue complexes to restore skin defects] // *Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovaniy – International Journal of Applied and Basic Research.* 2016; 4: 703–706 (in Russian).
- Denisov V.M., Anfimov P.E., Krasnova N.S., Kupriyanov V.A., Struchkov A.A. Plynochnoe pokrytie dlya ran [Pods Film coating for wounds]. Patent RF – Russian patent 2136318, 1999 (in Russian).
- Gryaznuhin E.H.G., Savel'ev V.I., Anisimova L.O. Lechenie ran pod biologicheskim strupom iz razmel'chyonnoj demineralizovannoj kostnoj tkani [Wound healing under the scab of biological razmelchënnoy demineralized bone] // *Sovremennye podbody k razrabotke ehffektivnyh perev'yazochnyh sredstv, shovnyh materialov i polimernyh implantatov – Modern approaches to the development of effective wound dressings, sutures and polymeric implants.* 1998: 60–62 (in Russian).
- Movsarova Z.M. Lechenie ran s ispol'zovaniem razmel'chyonnoj demineralizovannoj kostnoj tkani

- [Treatment of wounds with crushed demineralized bone]. Medical Phd thesis abstract. SPb., 1998: 21 (in Russian).
12. Greenholgh D. Role of growth factors in wound healing // *J. Trauma*. 1996; 41 (1): 159–167 (in Russian).
13. Struchkov A.A., Anfimov P.E., Kulakova K.V., Bugrov S.N. Primenenie ranevogo pokrytiya «Biotekst» dlya mestnogo lecheniya ozhogov [The use of wound coverage “Biotekst” for the topical treatment of burns] // *Voprosy traumatologii i ortopedii – Questions of Traumatology and Orthopedics*. 2012; 2: 16–17 (in Russian).
14. Kulakova K.V., Bugrov S.N., Aleynik D.Ya., Struchkov A.A. Rezul'taty primeneniya razrabatyvaemyh biologicheski aktivnyh materialov na osnove kollagena dlya zameshcheniya tkanevyh defektov v ehksperimente [The results of application of developed bioactive materials based on collagen to fill tissue defects in experiment] // *Tekhnologii zhivyyh sistem – Living Systems Technologies*. 2013; 10 (8): 59–64 (in Russian).

Received September 05.2016

Accepted December 01.2016

**Kulakova Ksenia V.**, PhD, Researcher, Group of Conservation Tissue, Privolzhsky Federal Research Medical Centre, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

**Aleynik Diana Y.**, PhD, Senior Scientific Reseacher, Chief of the Group of Biotechnology, Privolzhsky Federal Research Medical Centre, Russian Federation, Nizhny Novgorod.

**Charykova Irina N.**, Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Group of Biotechnology, Privolzhsky Federal Research Medical Centre, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

(✉) **Kulakova Ksenia V.**, e-mail: kulakova-k@yandex.ru