

## СТАБИЛЬНОСТЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ДНК-АПТАМЕРОВ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА ПОВЕРХНОСТИ УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ, ПРИМЕНИМЫХ В СИСТЕМАХ ДИАГНОСТИКИ И ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ \*

М.Б. Раев, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

П.В. Храмцов, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

М.Д. Кропанева, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

В.П. Тимганова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

М.С. Бочкова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

С.А. Заморина, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

Разработана технология получения конъюгатов углеродных наночастиц с ДНК-аптамерами. Исследованы и оптимизированы условия синтеза и сохранности структурно-функциональных свойств получаемых конструкций с позиции их стабильности при длительном хранении. В первую очередь это касается перспектив применения таких конъюгатов в *in vitro* диагностики и таргетной терапии. Особое значение имеют полученные данные об устойчивости к воздействиям внешней среды и атаке биологически активными соединениями (эндонуклеазами). Именно активность этих молекул по отношению к нуклеиновым кислотам и их фрагментам составляет основное препятствие для использования аптамеров в *in vivo* диагностике и терапевтической практике. Полученные результаты свидетельствуют в пользу реального решения существующих проблем.

**Ключевые слова:** аптамеры, ДНК, РНК, углеродные наночастицы, диагностика, нуклеазы, стабильность.

### Введение

ДНК- и РНК-аптамеры представляют собой одноцепочечные последовательности (20–60 нуклеотидов), выделяемые из большого пула случайных последовательностей и обладающие способностью к высокоспецифическому взаимодействию с соответствующими мишенями: клетка-

ми, биомолекулами, ионами и т.д. Специально разработанная технология SELEX (рис. 1) (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) позволяет эффективно выделять и относительно недорого получать практически неограниченное количество аптамеров заданной специфичности [9].

\* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ, проект № 16-44-590427 и в рамках государственного задания, номер государственной регистрации темы: 01201353246.

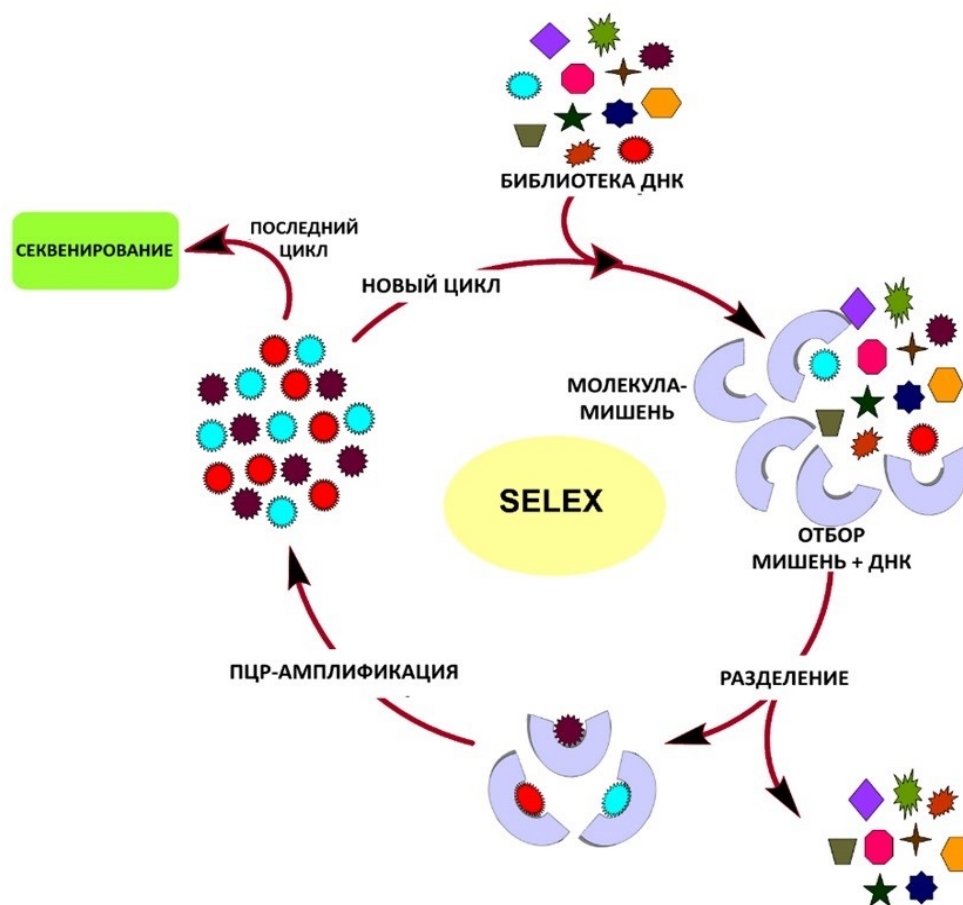


Рис. 1. Схема технологии SELEX.

[Адаптировано с изменениями с сайта University of Southern Denmark, <http://www.sdu.dk/en>]

Функциональные способности аптамеров делают их значимыми конкурентами моноклональных антител по целому ряду параметров. Однако одним из основных ограничений практического использования аптамеров является их низкая устойчивость к воздействию клеточных и внеклеточных нуклеаз. Иммунизация аптамеров – один из наиболее многообещающих подходов к решению этой проблемы. Углеродные наночастицы – перспективный материал-носитель биомолекул в области биотехнологии, диагностики, таргетной доставки лекарственных средств. В настоящее время имеется множество данных об аптамерах, иммобилизованных на наночастицах различной природы, главным образом золотых, их стабильности и свойствах. Однако углеродным наночастицам внимание практически не уделено. В связи с этим целью представ-

ленной работы являлось исследование стабильности и функциональных свойств РНК- и ДНК-аптамеров, иммобилизованных на поверхности углеродных наночастиц, пригодных для использования в системах специфического взаимодействия (молекулярная диагностика, высоко технологичная терапия).

В задачи исследования входило:

1. Осуществить эффективную иммобилизацию на поверхности углеродных наночастиц олигонуклеотидов:  
 ДНК-аптамера 5'-GGGGCACGTTTATCCGTCCCTCCTAGTG-GCGTGCCCC-3', специфичного к IgE человека; РНК-аптамера 5'-GGAGGUGCUCGAAAGGAACUCC-3', специфичного к Fc-фрагменту IgG человека.
2. Разработать твердофазную дот-иммуноаналитическую тест-систему и исследовать с её помощью функцио-

нальную активность иммобилизованных аптамеров в сравнении с активностью нативных аптамеров (находящихся в свободном состоянии);

3. Оценить динамику изменения функциональной активности иммобилизованного аптамера при хранении в различных температурных условиях:  $-80^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $+4^{\circ}\text{C}$ ,  $+25^{\circ}\text{C}$ ,  $+37^{\circ}\text{C}$  в течение нескольких месяцев в виде суспензии;

4. Сконструировать модели твердофазных аналитических систем, предназначенной для детекции IgE и IgG, специфичных к ряду актуальных антигенов в сыворотке крови человека.

Решение сформулированных задач носит очевидную практическую значимость как в части совершенствования практики медицинской диагностики, так и перспектив применения подобных конструкций в таргетной терапии.

### **Материалы и методы**

Для иммобилизации аптамеров были использованы два подхода. Получение конъюгатов прямым связыванием аптамеров с поверхностью углеродных наночастиц и посредством взаимодействия аптамеров, меченных биотином, с предварительно функционализированными частицами.

В работе использовали аминированные ( $\text{NH}_2$ -B17.4;  $\text{NH}_2$ -Apt 8 и  $\text{NH}_2$ -ТВА) и биотинилированные аптамеры (Bi-D17.4; Bi-Apt 8 и Bi-ТВА), специфичные к иммуноглобулинам E (IgE), иммуноглобулинам G (IgG) и тромбину соответственно. Частицы коллоидного углерода получали и функционализировали авторским методом [2]. Существенным моментом является то, что разработанная технология весьма универсальна и позволяет осуществлять функционализацию не только наночастиц коллоидного углерода, но и магнитные наночастицы, представляющие собой композитные металл-углеродные конструкции [5].

При иммобилизации биотинилированных и аминированных частиц использовали в первом случае наночастицы, предва-

рительно функционализированные стрептавидином, во втором – пептизированные, обработанные глутаровым альдегидом. На первом этапе синтеза поверхность углеродных частиц гидрофилизировали БСА, на втором этапе при помощи сшивающего агента (глутаральдегида) частицы ковалентно функционализировали стрептавидином. Синтезированные конъюгаты инкубировали с биотинилированными аптамерами, после чего свободный аптамер отделяли при помощи хроматографии. При иммобилизации аминированных аптамеров обработанные глутаральдегидом наночастицы инкубировали с аптамерами, свободные аптамеры отделяли при помощи хроматографии. Концентрацию углеродных наночастиц измеряли спектрофотометрически, по интенсивности поглощения на 450 нм, исходя из данных о том, что интенсивность поглощения суспензии с массовой долей углеродных наночастиц 0,03% равна 14 оптическим единицам (авторский метод, защищен патентом РФ) [1].

Для каждого из конъюгатов количественно оценивали способность специфически сорбировать биотинилированный аптамер за счет взаимодействия стрептавидин-биотин. Для этого суспензии конъюгатов C-Str разводили в ЗФРТ до концентрации 0,01% (массовая доля) и инкубировали с биотинилированным и небитинилированным (контрольным) ДНК-аптамером D17.4 в концентрациях 400, 100, 25, 6 и 1,5 нМ в объеме 500 мкл в течение 1 часа при  $+37^{\circ}\text{C}$ . Оба аптамера по 3'-концу были мечены карбоксифлуоресцеином (FAM). Соответственно, их обозначали как Bi-D17.4-FAM и D17.4-FAM. По окончании инкубации смеси центрифугировали при 20 000g в течение 90 мин. до полного осаждения наночастиц. Количество сорбированного аптамера оценивали по снижению флуоресценции в супернатанте. Для каждого из конъюгатов эксперимент повторяли трехкратно, каждый эксперимент, в свою очередь, включал три технические повторности. Аналогичным образом количественно оценивали сорбцию аминированного аптамера.

Исследовали десорбцию ДНК-аптамера с поверхности углеродных наночастиц. Для этого суспензии наночастиц, разведенных в ЗФРТ 1:100, объем 500 мкл центрифугировали 100 мин при 20 000g. Супернатанты декантировали и оценивали в них флуоресценцию. Для конъюгирования использовали IgE-специфичный аптамер, меченный FAM. При его десорбции или разрушении связь флуоресцентной метки с наночастицей нарушалась, что приводило к переходу метки в растворимое состояние. Чем интенсивнее были эти процессы, тем выше был уровень флуоресценции в супернатантах.

Основной задачей было подобрать оптимальное соотношение частиц и аптамеров, позволяющее с получить конъюгат наибольшей эффективностью в плане количества иммобилизованного олигонуклеотида. Установлено, что для биотинилированных аптамеров оптимальное соотношение аптамера и наночастиц, при котором сорбируется наибольшая доля аптамера, составляет 256 пМ/мг (рис. 2).

Аминированные аптамеры конъюгировали с наночастицами, обработанными

бычьим сывороточным альбумином БСА и глутаровым альдегидом (ГА). Для такого подхода к иммобилизации аптамеров оптимальное соотношение составляло 128 пМ аптамера на 1 мг наночастиц.

Помимо оценки результатов по изменению уровня флуоресценции раствора аптамера после инкубации с наночастицами успешности иммобилизации был твердофазный дот-анализ, который предусматривал прямое взаимодействие конъюгатов наночастиц с аптамерами с мишенями, иммобилизованными на поверхности полистирольных планшетов.

### Основные результаты

Разработка твердофазной дот-аналитической системы послужила решению проблемы оперативной оценки функциональной активности аптамеров. На подложку (лунки планшетов из непрозрачного полистирола) сорбировали молекулы-мишени в возрастающих концентрациях. Далее планшеты промывали, а затем вносили суспензии углеродных наночастиц, конъюгированных с аптамерами. Чувствительность такой детекции (вариант прямого определения) составля-

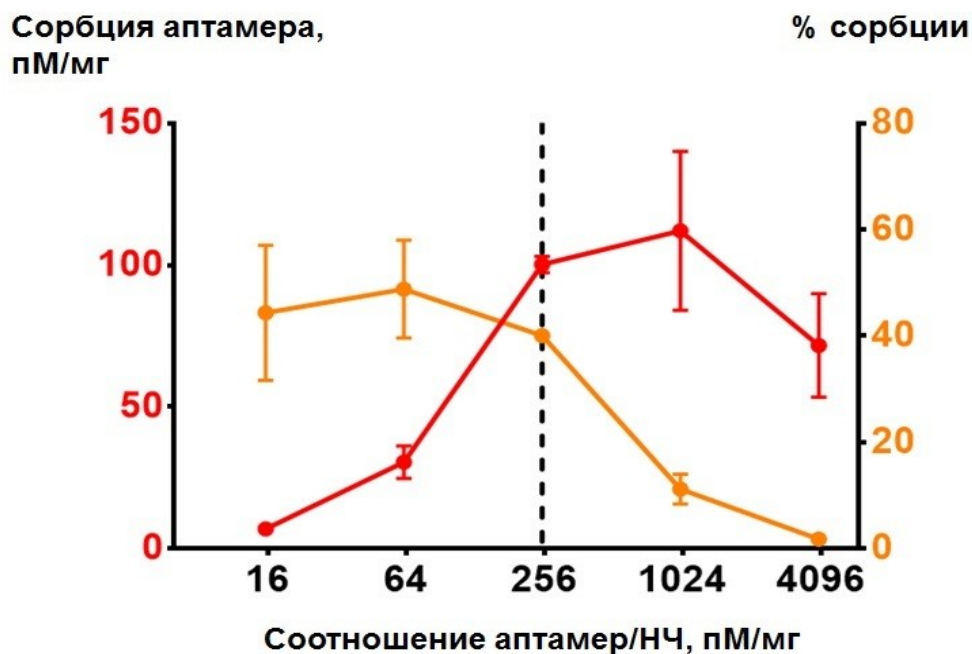


Рис. 2. Зависимость эффективности сорбции аптамера Vi-D17.4 от его соотношения с количеством наночастиц, функционализированных стрептавидином

ла 5 мкг/мл для IgE, 10 мкг/мл для IgG и для биотинилированных, и для аминированных аптамеров. Разработанная дот-аналитическая система была использована для оценки функциональной активности свободного аптамера. Для этого в лунки планшетов вносили серийные разведения биотинилированного аптамера, а затем углеродные наночастицы, модифицированные стрептавидином. Параллельно проводили исследования стабильности синтезированных реагентов. Снижения активности свободных и иммобилизованных аптамеров при хранении при температуре +4°C и -20°C не наблюдалось. В условиях хранения аптамеров в нейтральном фосфатном буфере при +37°C наблюдалось снижение активности свободных и иммобилизованных аптамеров приблизительно на 70% за 1 месяц.

*Оценка динамики изменения функциональной активности* иммобилизованного аптамера при хранении в различных температурных режимах и составах среды позволила решить проблему низкой стабильности полученных реагентов.

Были синтезированы две партии конъюгатов, алиquotы из каждой партии были заложены на хранение в разные условия: +4°C, +37°C, -20°C. Различие между способом хранения каждой из партий заключалось в составе буфера: в одном случае это был фосфатный буфер, содержащий твин-20 (ЗФРТ) и 2мМ ЭДТА, в другом случае ЭДТА не был добавлен. Кроме того, половину алиquot из каждой партии выдерживали при +70°C в течение 30 мин. Таким образом, мы тестировали 4 способа хранения конъюгатов углеродных наночастиц с аптамерами (в качестве модели использовали анти-IgE аптамер), отличающиеся составом буфера:

1. ЗФРТ+2мМ ЭДТА.
2. ЗФРТ+2мМ ЭДТА + тепловая обработка +70°C, 30 мин.
3. ЗФРТ.
4. ЗФРТ + тепловая обработка +70°C, 30 мин.

Выбранные условия хранения являются стандартными при работе с биоконъю-

гатами. Хранение образцов при +37°C является обычным методом так называемых ускоренных тестов на стабильность, широко используемых, например, для расчета сроков хранения наборов для иммуноферментного анализа. Температура -80°C не была использована в виду своей ограниченной доступности для широкого спектра исследователей, к тому же предварительные тесты показали, что температура -20°C обеспечивает достаточную сохранность конъюгатов. От хранения при +25°C также отказались ввиду того, что с точки зрения реальной практики хранение препаратов при этой температуре не применяется, а если и имеет место, то лишь в течение коротких периодов времени. Иногда хранение препаратов при +25°C используется для уже упомянутых экспресс-тестов стабильности, но мы посчитали, что данных о сохранности конъюгатов при +37°C будет достаточно, чтобы осуществить подобную оценку.

Было показано, что функциональная активность конъюгатов не снижается при добавлении в буфер ЭДТА в условиях хранения при температуре +4°C и -20°C. Хранение при отрицательной температуре позволяло сохранить функциональную активность конъюгата независимо от состава буфера. Предварительное прогревание при +70°C в течение 30 мин. позволяло сохранить свойства конъюгата при хранении при температуре +4°C и даже, в некоторой степени, при +37°C. В целом, предварительное прогревание само по себе ухудшало способность конъюгатов наночастиц с анти-IgE – аптамерами взаимодействовать с IgE, интенсивность сигнала падала примерно в полтора раза.

Данные о десорбции аптамера, в целом, полностью соответствовали динамике изменения функциональной активности. Десорбция ДНК-аптамера не наблюдалась в ходе месяца хранения при +4°C и -20°C в условиях добавления ЭДТА либо предварительной тепловой обработки.

Стабильность ДНК-аптамеров, иммобилизованных на поверхности оценивали в нескольких экспериментах по оценке

уровня и сохранении реальной функциональной активности конъюгатов.

Функциональную активность синтезированных реагентов (способность специфически взаимодействовать с IgE человека) тестировали при помощи дот-иммуноанализа в лунках белых полистирольных планшетов. Моноклональные IgE, разведенные в ЗФР до 20 мкг/мл сорбировали точками по 3 мкл на дно лунок планшетов, помещали во влажную камеру в термостат +37°C на 30 минут. Далее лунки промывали ЗФРМК, затем добавляли конъюгат C-Str-Bi-D17.4-FAM, разведенный в ЗФРМК с 1% казеина до концентрации 0,03% углеродных наночастиц и инкубировали 60 мин в термостате при +37°C на шейкере. В области сорбции IgE происходило его взаимодействие с C-Str-Bi-D17.4-FAM, что приводило к формированию темных окрашенных точек. Конъюгат C-Str-Bi-D17.4-FAM не взаимодействовал с иммобилизованными на поверхности лунок IgG человека и БСА в концентрации 20 мкг/мл. Структурные свойства C-Str-Bi-D17.4-FAM, их агрегатную устойчивость оценивали по сохранению размеров наночастиц и их дзета-потенциалу.

Размеры и дзета-потенциал наночастиц определяли методом обратного динамического светорассеяния на приборе Malvern ZetaSizer NanoZS, измеряющем светорассеяние частиц под углом 173°. Суспензии наночастиц разводили в 500 раз в 1,5 мл ЗФР, фильтрованного через шприцевой фильтр с диаметром пор 0,2 мкм.

Для измерения дзета-потенциала наночастицы разводили в 700 мкл бидистиллированной воды 1:100 (такой метод разведения обеспечивал значение pH $\approx$ 7), для измерения использовали многоразовый погружной электрод Zeta Dip Cell.

Важной частью работы являлась оценка устойчивости аптамеров, иммобилизованных на наночастицах к воздействию нуклеаз сыворотки крови. К частицам C-Str-Bi-D17.4-FAM добавляли раствор ДНКазы I до финальной концентрации 0,17 Ед/мл, что соответствует ее ак-

тивности в сыворотке крови [4], а также соли магния, калия, кальция и натрия до концентраций, соответствующих их содержанию в сыворотке крови. В качестве контроля использовали аналогичную смесь без добавления ДНКазы. Обе смеси инкубировали в течение 60 мин. при +37°C, после чего инактивировали ДНКазу прогреванием при +75°C в течение 10 мин., затем частицы отделяли центрифугированием при 20 000g в течение 15 минут и измеряли флуоресценцию в супернатантах. Эксперимент повторяли трехкратно ( $n=5$ ), сравнение групп проводили при помощи дисперсионного анализа с использованием критерия Тьюки, при этом лишь в одном из трех экспериментов вероятность ошибки первого рода составила менее 5% (1,6%, без поправки на множественные сравнения).

Размеры частиц не изменялись при хранении при +4°C и -20°C, при этом наночастицы агрегировали при +37°C, если не подвергались тепловой обработке. В условиях предварительной тепловой обработки агрегации не происходило. По всей видимости, снижение функциональной активности и нарушение структурной стабильности суспензий наночастиц связано не только с нуклеазами, но и с другими биологически активными системами, чувствительными к повышенным температурам, возможно пептидазами.

*Конструирование моделей твердофазных аналитических систем*, предназначенных для детекции IgE и IgG, специфичных к ряду актуальных антигенов в сыворотке крови человека носит очевидную практическую направленность.

Были разработаны диагностические системы в формате дот-анализа, предназначенные для детекции IgE к антигену кошачьей шерсти Fel d1 и IgG к столбнячному анатоксину. В ходе анализа в качестве диагностикумов использовали конъюгаты углеродных наночастиц с биотинилированными аптамерами, специфичными к IgE и IgG. Поверхность лунок планшета из непрозрачного полистирола сенсibilizировали антигеном Fel d1

в концентрации 0,1 мг/мл или столбнячным анатоксином в концентрации 0,05 мг/мл. В качестве контроля использовали препарат противостолбнячных человеческих антител (ТЕ-3, стандарт ВОЗ) и поликлональные антиFel d1 антитела. Чувствительность детекции противостолбнячных антител составила 0,1 МЕ/мл, антиFel d1 антител – 50 нг/мл. В качестве блокирующего реагента использовали 1% раствор казеина. Концентрация углеродных наночастиц составляла 0,03%. Для оценки интенсивности окрашивания точек на твердой фазе планшеты фотографировали, цвет точек оценивали при помощи программы ImageJ. Конъюгаты наночастиц с аптамерами имеют очевидные перспективы для использования в *in vitro* диагностике [8], терапии [7], имаджинге [3]. Исследование их свойств, оптимизация условий синтеза, хранения, разработка подходов к характеристике являются приоритетными направлениями с точки зрения трансляции разработок в практику. Разработанные в ходе реализации проекта технологии синтеза стабильных конъюгатов углеродных наночастиц с аптамерами могут быть использованы для создания колориметрических и электрохимических сенсоров.

### Заключение

Таким образом, по итогам проведенных исследований получены новые данные о функциональной активности олигонуклеотидных аптамеров иммобилизованных на поверхности углеродных наночастиц. Впервые осуществлена иммобилизация ДНК-аптамеров на частицах коллоидного угля, исследованы размеры полученных частиц. Разработан оригинальный подход к оперативной оценке функциональной активности иммобилизованных на наночастицах аптамеров, основан-

ный на адаптации для этой цели принципа твердофазного дот-иммуноанализа.

Разработаны твердофазные реагенты для иммуноанализа на основе пористой (нитроцеллюлоза) и непористой (полистирол) подложек. Оптимизирована процедура количественного анализа IgE, специфичных к антигену fel d1. Подобраны состав буфера для блокирования, рабочий титр исследуемой сыворотки, а также временные параметры инкубации иммуносорбента с сывороткой и диагностикумом. Проведена оценка чувствительности и специфичности количественной детекции IgE с использованием диагностикума на основе углеродных наночастиц и IgE-специфичного аптамера. Подтверждено предположение о том, что аптамеры, имеющие структуру G-квадруплексов, сохраняют свои структурно-функциональные свойства при длительном хранении при иммобилизации на поверхности углеродных наночастиц [6].

Оптимизирована технология синтеза конъюгатов углеродных наночастиц с ДНК-аптамерами. Воспроизводимость технологии подтверждена результатами более чем 10 синтезов конъюгатов на основе трех различных партий углеродных наночастиц.

Данные впервые получены для конъюгатов наночастиц аморфного углерода и ДНК-олигонуклеотидов.

Наиболее перспективными областями применения полученных стабильных реагентов, по нашему мнению, являются:

1. Диагностика *in vitro*: область разработки колориметрических тестов, а именно иммунохроматографических, дот-аналитических, микрофлюидных бумажных тестов.
2. Диагностика *in vitro*: разработка электрохимических сенсоров.
3. Адресная доставка лекарственных средств, в том числе с применением наночастиц, покрытых углеродной оболочкой.

### Библиографический список

1. Плаксин Д.Ю., Раев М.Б., Громаковская Е.Т. Патент РФ № 2089912 от 10.09.1997.
2. Раев М.Б. Частицы коллоидного углерода в системах неинструментальной диагностики // Клиническая лабораторная диагностика. – 2008. – № 2. – С. 45–48.

3. *Bouvier-Müller A., Ducongé F.* Application of aptamers for in vitro Molecular Imaging and Theranostics // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2018. – Vol. 134. – P. 94–106.
4. *Cherepanova A.V., Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E., Vlassov V.V., Laktionov P.P.* Deoxyribonuclease Activity and Circulating DNA Concentration in Blood Plasma of Patients with Prostate Tumors // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 1137. – № 1. – P. 218–221.
5. *Khramtsov P., Kropaneva M., Byzov I., Minin A., Mysi, A., Timganova V., Bochkova M., Uimin M., Zamorina S., Yermakov A., Rayev M.* Conjugation of carbon coated-iron nanoparticles with biomolecules for NMR-based assay // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2019. – Vol. 176. – № 1. – P. 256–264.
6. *Khramtsov P.V., Kropaneva M.D., Kalashnikova T.V., Zamorina S.A., Rayev M.B., Bochkova M.S., Timganova V.P.* Highly stable conjugates of carbon nanoparticles with dna aptamers // *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*. – 2018. – Vol. 34. – № 35. – P. 10321–10332.
7. *Tan K., Pan S., Jeevanandam J., Danquah M.K.* Cardiovascular therapies utilizing targeted delivery of nanomedicines and aptamers // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2019. – Vol. 558. – P. 413–425.
8. *Yang, Y., Yang, X., Yang, Y., Yuan Q.* Aptamer-Functionalized Carbon Nanomaterials Electrochemical Sensors for Detecting Cancer Relevant Biomolecules // *Carbon*. – 2018. – Vol. 129. – P. 380–395.
9. *Zhuo Z., Yu Y., Wang M.* [et al.] Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – Vol. 18. – № 10. – P. 2142–2161.

**STABILITY AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF DNA APTAMERS IMMOBILIZED ON THE SURFACE OF CARBON NANOPARTICLES APPLICABLE IN DIAGNOSTIC AND TARGET THERAPY SYSTEMS**

M.B. Rayev, P.V. Khramtsov, M.D. Kropaneva, V.P. Timganova, M.S. Bochkova, S.A. Zamorina

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS*

The technology has been developed for the preparation of conjugates of carbon nanoparticles with DNA aptamers. The synthesis and preservation of the structural and functional properties of the resulting structures from the standpoint of their stability during long-term storage have been studied and optimised. This concerns, first of all, the prospects of using such conjugates in in vitro diagnostics and targeted therapy. Of particular importance are the data on resistance to environmental influences and attack by biologically active compounds (endonucleases). It is the activity of these molecules to nucleic acids and their fragments that constitutes the main obstacle to the use of aptamers in in vivo diagnostics and therapeutic practice. The results obtained are in favour of a real solution to existing problems.

*Keywords:* aptamers, DNA, RNA, carbon nanoparticles, diagnostics, nucleases, stability.

**Сведения об авторах**

*Раев Михаил Борисович*, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН (ИЭГМ УрО РАН), 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета, Пермский государственный национальный исследовательский университет (ПГНИУ), 614990, Пермь, ул. Букирева, 15; e-mail: mraev@iegm.ru

*Храмцов Павел Викторович*, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, ИЭГМ УрО РАН; ассистент кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета, ПГНИУ; e-mail: khramtsov Pavel@yandex.ru

*Кропанева Мария Дмитриевна*, инженер, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: kropanevamasha@gmail.com

*Тимганова Валерия Павловна*, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: timganovavp@gmail.com

*Бочкова Мария Станиславовна*, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: krasnych-m@mail.ru

*Заморина Светлана Анатольевна*, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, ИЭГМ УрО РАН; профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета, ПГНИУ; e-mail: mantissa7@mail.ru

*Материал поступил в редакцию 23.10.2019 г.*