

УДК 616-092

Способы повышения воспроизводимости в измерениях жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста

Каба С.И., Егорова Е.М.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

В последние годы в исследованиях токсичности наночастиц на клетках *in vitro* активно обсуждаются вопросы методологии, в том числе возможности повышения воспроизводимости результатов измерений жизнеспособности клеток. Как известно, такие измерения являются наиболее часто используемым тестом на цитотоксичность, как для наночастиц, так и для других биологически важных материалов. В предложенной нами ранее оригинальной методике определения вкладов различных форм стабилизатора аэрозоля-ОТ (АОТ) в цитотоксичность водных растворов наночастиц серебра (НЧС) была обеспечена достаточно высокая воспроизводимость значений жизнеспособности клеток, чтобы получить достоверные количественные оценки различий средних значений жизнеспособности. Эта задача была решена путем изменения процедуры эксперимента по сравнению с обычно применяемой в этом направлении наномедицины. В результате оказалось возможным получить качественно новую информацию о механизме действия на клетки как поверхностно-активных веществ, так и наночастиц, стабилизированных такими веществами. В настоящей работе, на примере действия водного раствора АОТ на клетки эндотелия, описаны произведенные изменения процедуры, которые позволили существенно уменьшить стандартные отклонения от средних экспериментальных значений жизнеспособности клеток. Такие преобразования методики не специфичны как для экспериментов с растворами НЧС, стабилизированными АОТ, так и для клеток эндотелия и могут быть применимы в исследованиях цитотоксичности растворов различных биологически активных агентов (включая наночастицы металлов) на клетках разного типа.

Ключевые слова: жизнеспособность клеток; воспроизводимость; наночастицы серебра; цитотоксичность; МТТ-тест.

Для цитирования: Каба С.И., Егорова Е.М. Способы повышения воспроизводимости в измерениях жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста. *Патогенез*. 2021; 19(4): 75-79.

DOI: 10.25557/2310-0435.2021.04.75-79

Для корреспонденции: Каба Саид Ибрагимович, e-mail: said.kaba@gmail.com

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 21.10.2021.

Ways to improve the reproducibility of cell viability measurements with the MTT assay

Kaba S.I., Egorova E.M.

Institute of General Pathology and Pathophysiology,
Baltiyskaya St. 8, Moscow 125315, Russian Federation

In recent years, methodological aspects of *in vitro* studies of nanoparticle toxicity have been actively discussed, including a possibility to improve the reproducibility of cell viability measurements. Such measurements are known as the most common cytotoxicity test both for nanoparticles and for other biologically important materials. Earlier we suggested a novel method for determining contributions of various aerosol-OT (AOT) forms to the cytotoxicity of aqueous silver nanoparticle (AgNP) solutions. This method provides a sufficiently high reproducibility of cell viability values to obtain reliable quantitative estimates of differences in average viability values. To solve this task, details of the procedure were modified from respective steps of the procedure commonly used in this area of nanomedicine. As a result, it became possible to obtain a qualitatively new information about the mechanism of action on cells of both surfactants and surfactant-stabilized nanoparticles. In the present work using the action of an aqueous AOT solution on endothelial cells as an example, we described the procedure-improving changes that allowed us to reduce significantly standard deviations from mean values of cell viability. Such changes are not specific for experiments neither with AOT-stabilized AgNPs solutions nor with endothelial cells but may be useful for cytotoxicity studies of solutions of biologically active agents (including metal nanoparticles) on various cell types.

Key words: cell viability; reproducibility; cytotoxicity; silver nanoparticles; MTT assay.

For citation: Kaba S.I., Egorova E.M. [Ways to improve the reproducibility of cell viability measurements with the MTT assay]. *Patogenesis* [Pathogenesis]. 2021; 19(4): 75-79 (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2021.04.75-79

For correspondence: Kaba Said Ibragimovich, e-mail: said.kaba@gmail.com

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received: 21.10.2021

Введение

Как известно, в разных направлениях токсикологических исследований, в том числе и в нанотоксикологии, степень опасности действия вводимых агентов на человеческий организм оценивается по результатам экспериментов на модельных системах — на животных (*in vivo*) и на клетках (*in vitro*). Большая часть работ проводится на клетках, главным образом из-за существенно большей трудоёмкости и дороговизны экспериментов на животных [1-3]. Поэтому результаты исследований на клетках играют весьма важную роль в оценках токсичности наночастиц и наноматериалов, и, соответственно, в возможностях их применения в биологии и медицине. В связи с этим в последние годы в литературе активно обсуждаются проблемы надежности результатов таких исследований, а также их применимости для оценок реальной токсичности для человека [1, 4–6]. Серьёзное внимание здесь уделяется вопросам методологии, в том числе воспроизводимости результатов, полученных на одинаковых объектах в разных лабораториях. В качестве причин расхождений рассматриваются наиболее общие характеристики — способы синтеза, параметры и предварительная подготовка используемых наночастиц, параметры (размеры, происхождение) клеток и основные позиции в процедуре эксперимента (доза наночастиц, способ введения и др.) [1, 4].

При этом почти не уделяется внимание воспроизводимости результатов измерений жизнеспособности клеток, несмотря на то что эти измерения являются наиболее часто используемым (основным) тестом на цитотоксичность, и полученные с помощью этого теста данные, на сегодняшний день, служат фактически базовым критерием для оценки токсичности наночастиц в экспериментах на клеточных культурах. Между тем, в известной нам литературе этого направления часто встречаются публикации, в которых показаны весьма существенные стандартные отклонения от средних измеряемых значений жизнеспособности, причем это, как правило, не обсуждается авторами, хотя может иметь значение для оценки достоверности этих результатов и соответственно, надежности выводов; примеры можно найти в [7, 8]. Возможно, это объясняется тем, что изменения жизнеспособности рассматриваются обычно либо как способ определения полуингибирующей концентрации (IC50) или летальной дозы, либо просто как качественная характеристика токсического действия наночастиц в исследуемом интервале их концентраций, используемая в дальнейшем для решения других задач в той же работе. При этом достоверность количественных оценок различий средних значений жизнеспособности клеток в данном диапазоне концентраций наночастиц оказывалась несущественной.

Тот же недостаток внимания к степени воспроизводимости значений жизнеспособности клеток присутствовал ранее и в наших определениях токсичности растворов наночастиц серебра (НЧС), стабилизирован-

ных аэрозолем-ОТ (АОТ) с помощью МТТ-теста на нескольких типах клеток [9–11]. С развитием этих исследований была обнаружена собственная токсичность стабилизатора, и перед нами встала задача выяснения механизма его действия на клетки (как в виде водного раствора, так и в составе раствора НЧС). Для этого была разработана оригинальная методика определения отдельных вкладов двух форм стабилизатора (мономеров и мицелл) в водном растворе, что позволило продвинуться в понимании механизма цитотоксичности наночастиц металлов, стабилизированных поверхностно-активными веществами [12, 13]. Оказалось, однако, что определение отдельных вкладов двух форм стабилизатора предполагало достоверность количественных оценок различия средних значений жизнеспособностей, то есть достаточно малые отклонения от средних значений для всех концентраций АОТ в исследуемом диапазоне. Иначе говоря, требовалось обеспечить достаточно высокую воспроизводимость результатов измерения жизнеспособности клеток.

В проведенных ранее измерениях на клетках Jurkat отклонения от средних значений жизнеспособности удовлетворяли этому условию [11, 12]. В то же время, в измерениях на клетках эндотелия эти разбросы были заметно более значительными, поэтому возникла необходимость усовершенствования методики определения изменений жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста для уменьшения разбросов средних значений и повышения воспроизводимости результатов.

Для выявления причин разброса измеряемых значений жизнеспособности были тщательно изучены возможные факторы, из-за которых может увеличиваться вариабельность данных и которые влияют на воспроизводимость в целом. Было найдено, что возможно повысить воспроизводимость путем изменения некоторых позиций в процедуре эксперимента. В настоящей работе описаны разработанные изменения методики и показан эффект таких изменений на воспроизводимость результатов измерений жизнеспособности на примере клеток эндотелия после инкубации с водным раствором 1,7 мМ АОТ в 8 мМ KNO₃; такой раствор использовали для определения токсического действия мономерной формы АОТ [12].

Материалы и методы исследования

Приготовление раствора АОТ. Для исследования использовали 1,7 мМ раствор АОТ (бис(2-этилгексил)сульфосукцинат натрия, 96%, «Merck», Германия) в растворе 8 мМ нитрата калия. Вначале готовили раствор нитрата калия в дистиллированной воде, затем вносили в него АОТ и растворяли при перемешивании.

Культура эндотелиальных клеток. В работе использовали линию EA.hy926 — эндотелиальные клетки пупочной вены человека, гибридизированные с клетками линии A549 (лёгочная аденокарцинома человека). Клетки были любезно предоставлены С. J. Edgell (Университет

Северной Каролины, США) [14]. Субкультивирование проводили в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, смеси заменимых аминокислот, смеси НАТ и 2 ммоль/л L-глутамин. Клетки содержались в инкубаторе «New Brunswick Galaxy 48 R» («Erpendorf», Германия) при 37°C в увлажнённой атмосфере с 5% углекислого газа. Клеточный монослой растили в культуральных флаконах площадью 25 см². Пассирование клеток проводили 2 раза в неделю, открепляя монослой раствором трипсина в растворе Версена («ПанЭко», Россия), оценивая концентрацию и жизнеспособность клеток методом отторжения красителя трипанового синего путём подсчёта в автоматическом счётчике клеток «Countess» («Thermo Fischer Scientific», США) в соответствии с инструкцией к прибору, и далее помещая клетки в свежую клеточную среду ($2,5 \times 10^4$ клеток/мл, или $1,5 \times 10^4$ клеток на флакон). Для экспериментов использовали клетки с жизнеспособностью не менее 95%.

Оценка жизнеспособности клеток. Инкубацию клеток с АОТ проводили в 96-луночных микропланшетах. В лунки планшета вносили 5×10^4 клеток в 200 мкл среды, затем планшет инкубировали 24 ч в инкубаторе (при 37°C в увлажнённой атмосфере с 5% CO₂). Далее в лунки вносили раствор АОТ при разведениях в 108; 54; 36; 27; 21,6; 18 и 15,4 раза, что соответствовало концентрациям наночастиц серебра в среде 1–7 мкг/мл (с шагом 1 мкг/мл). Такие разведения (далее упоминаемые как стандартные) использовали во всех экспериментах с клетками. В качестве отрицательного контроля использовали дистиллированную воду. Клетки инкубировали 24 ч.

После инкубации клетки однократно отмывали в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4), затем к ним вносили свежую культуральную среду DMEM и раствор МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид) до концентрации 500 мкг/мл и до объёма 200 мкл. Через 4 ч инкубации с МТТ из лунок аккуратно отбирали среду, вносили по 100 мкл диметилсуль-

фоксида и оставляли планшеты на 20 мин в темноте при комнатной температуре. Оптическую плотность полученного раствора формазана в лунках измеряли на фотометре «Chameleon V» («Hidex», Финляндия) при 544 нм. Жизнеспособность клеток вычисляли как долю оптической плотности испытуемых клеток от оптической плотности контрольных клеток (инкубированных с дистиллированной водой), выраженную в процентах.

Результаты исследования и обсуждение

Осуществленные нами изменения в процедуре эксперимента с соответствующими комментариями приведены в **табл. 1**.

Как видно из таблицы, было увеличено вдвое число лунок-повторов для каждой концентрационной точки, уменьшено время предварительной инкубации клеток до одних суток, а также было уменьшено до одной число отмывок клеток после инкубации с АОТ перед определением жизнеспособности по МТТ-тесту.

Такие меры позволили снизить вариабельность результатов и, соответственно, уменьшить величину стандартного отклонения в анализируемых данных. В качестве примера на **рис. 1** показаны данные по цитотоксичности раствора АОТ исходной концентрации 1,7 мМ в растворе с 8 мМ KNO₃ до и после изменений процедуры, приведенных в **табл. 1**.

Соответствующие средние значения и стандартные отклонения представлены в **табл. 2**. Как видно из таблицы, введенные изменения условий эксперимента позволили заметно уменьшить стандартные отклонения при всех исследованных концентрациях АОТ.

Важно отметить, что проведенные изменения не являются специфичными для используемых нами растворов АОТ и НЧС, а также не зависят от метода определения жизнеспособности клеток. В то же время такого рода изменения продемонстрированы нами на культуре адгезивных клеток и должны рассматриваться с учётом этого обстоятельства, так как снижение потерь ад-

Таблица 1

Изменения в процедуре эксперимента: в левом столбце показаны позиции до изменений процедуры, которые обычно применяются в экспериментах на клетках в формате 96-луночного планшета; в среднем столбце – изменения этих позиций в наших экспериментах с НЧС или АОТ на клетках эндотелия

Процедура до изменений	Процедура после изменений	Комментарий
3 экспериментальные точки на образце	6 экспериментальных точек на образце	Увеличение числа точек способствовало повышению надёжности результатов в целом
Инкубация клеток в микропланшетах в течение 48–72 ч перед инкубацией с растворами наночастиц или стабилизатора	Инкубация клеток в микропланшетах в течение 24 ч перед инкубацией с растворами наночастиц или стабилизатора	Число клеток от лунки к лунке всегда варьируется. Чтобы снизить такую вариабельность на стадии инкубации после внесения клеток в лунки, время инкубации снижено настолько, чтобы клетки успели прикрепиться к лункам, но не увеличиться в численности
Двойная или тройная отмывка монослоя клеток после инкубации с растворами наночастиц или стабилизатора	Однократная отмывка монослоя клеток с предварительным центрифугированием микропланшета	Снижение числа отмывок до одной, а также предварительное центрифугирование позволили сохранить для дальнейшего анализа открепившиеся или слабо прикреплённые живые клетки

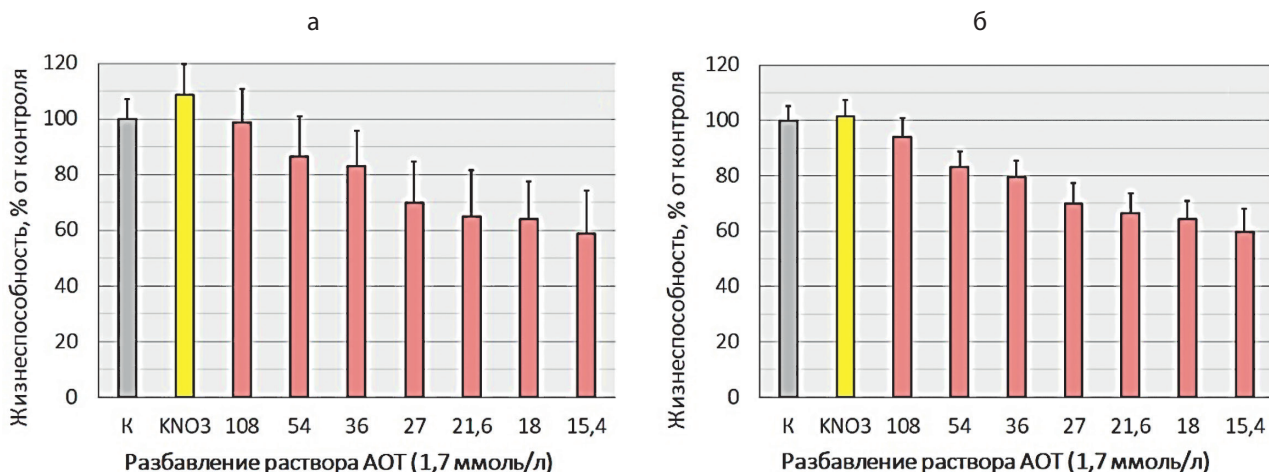


Рис. 1. Цитотоксичность раствора АОТ (1,7 мМ в 8 мМ KNO₃) по отношению к клеткам EA.hy926 в тесте МТТ до описываемых изменений в процедуре теста (а) и после таких изменений (б). К – контроль.

Таблица 2

Сведения о цитотоксичности раствора АОТ (1,7 мМ в 8 мМ KNO₃) по отношению к клеткам EA.hy926 в тесте МТТ. Приведены значения жизнеспособности клеток в контроле и при используемых в эксперименте разбавлениях раствора АОТ

До изменений	Разбавление раствора АОТ (1,7 мМ) в культуральной среде								
	Контроль	KNO ₃	108	54	36	27	21,6	18	15,4
Среднее (n = 18)	100,0	108,7	98,9	86,6	83,2	69,9	65,0	63,9	58,8
Станд. откл.	7,0	10,9	11,7	14,3	12,5	14,9	16,6	13,7	15,5
После изменений	Контроль	KNO ₃	108	54	36	27	21,6	18	15,4
Среднее (n = 21)	100,0	101,6	93,9	83,3	79,5	69,9	66,4	64,3	59,7
Станд. откл.	5,0	5,9	6,8	5,4	6,0	7,4	7,3	6,5	8,5

гезивных клеток на этапе отмытки лунок планшета выглядит более весомым по сравнению с суспензионными культурами клеток из-за более низкого числа монослойных клеток в лунке.

Заключение

Таким образом, описанные изменения процедуры эксперимента приводят к существенному уменьшению стандартных отклонений от средних значений жизнеспособности и могут быть полезны для повышения воспроизводимости результатов измерений жизнеспособности клеток при исследованиях токсического действия как растворов наночастиц или их стабилизаторов, так и других агентов, по крайней мере на адгезивных клетках разного происхождения.

Список литературы

- Hirsch C., Roesslein M., Krug H.F., Wick P. Nanomaterial cell interactions: are current in vitro tests reliable? *Nanomedicine*. 2011; 6(5): 837–847. DOI: 10.2217/nnm.11.88
- Arora S., Rajwade J.M., Paknikar K.M. Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012; 258(2): 151–165. DOI: 10.1016/j.taap.2011.11.010
- Pietrojusti A. Health implications of engineered nanomaterials. *Nanoscale*. 2012; 4(4): 1231–1247. DOI: 10.1039/c2nr11688j
- Faria M., Björnmalin M., Thurecht K.J., Kent S.J., Parton R.G., Kavallaris M., Johnston A.P.R., Gooding J.J., Corrie S.R., Boyd B.J., Thordarson P., Whittaker A.K., Stevens M.M., Prestidge C.A., Porter C.J.H., Parak W.J., Davis T.P., Crampin E.J., Caruso F. Minimum information reporting in bio–nano experimental literature. *Nat. Nanotechnol.* 2018; 13(9): 777–785. DOI: 10.1038/s41565-018-0246-4
- Faria M., Björnmalin M., Crampin E.J., Caruso F. A few clarifications on MIRIBEL. *Nat. Nanotechnol.* 2020; 15(1): 2–3. DOI: 10.1038/s41565-019-0613-9
- Rösslein M., Elliott J.T., Salit M., Petersen E.J., Hirsch C., Krug H.F., Wick P. Use of cause-and-effect analysis to design a high-quality nanocytotoxicology assay. *Chem. Res. Toxicol.* 2015; 28(1): 21–30. DOI: 10.1021/tx500327y
- Kaur J., Tikoo K. Evaluating cell specific cytotoxicity of differential-charged silver nanoparticles. *Food. Chem. Toxicol.* 2013; 51: 1–14. DOI: 10.1016/j.fct.2012.08.044
- Brkić Ahmed L., Milić M., Pongrac I.M., Marjanović A.M., Mlinarić H., Pavičić I., Gajović S., Vinković Vrček I. Impact of surface functionalization on the uptake mechanism and toxicity effects of silver nanoparticles in HepG2 cells. *Food. Chem. Toxicol.* 2017; 107(Pt A): 349–361. DOI: 10.1016/j.fct.2017.07.016
- Kaba S.I., Egorova E.M. In vitro studies of the toxic effects of silver nanoparticles on HeLa and U937 cells. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 2015; 8: 19–29. DOI: 10.2147/NSA.S78134
- Egorova E.M., Kaba S.I., Tlupova S.A. *Assessment of the Cytotoxicity of Silver Nanoparticles with Different Surface Charge*. In: *Advances in Nanotechnology*. Eds.: Bartul Z., Trenor J. New York: Nova Science Publishers; 2016: 25–48.
- Каба С.И., Соколовская А.А., Тлупова З.А., Егорова Е.М. Цитотоксическое действие наночастиц серебра с различным поверхностным зарядом по отношению к клеткам линии Jurkat. *Патогенез*. 2016; 14(3): 31–37.

12. Egorova E.M., Kaba S.I. The effect of surfactant micellization on the cytotoxicity of silver nanoparticles stabilized with aerosol-OT. *Toxicol. Vitro*. 2019; 57: 244–254. DOI: 10.1016/j.tiv.2019.03.006
13. Каба С.И., Егорова Е.М. Вклад стабилизатора в цитотоксичность наночастиц серебра в эксперименте на эндотелиальных и фибробластоподобных клетках. *Российские нанотехнологии*. 2020; 15(4): 540–549. DOI: 10.1134/S1992722320040056
14. Bauer J., Margolis M., Schreiner C., Edgell C.J., Azizkhan J., Lazarowski E., Juliano R.L. In vitro model of angiogenesis using a human endothelium-derived permanent cell line: contributions of induced gene expression, G-proteins, and integrins. *J. Cell. Physiol.* 1992; 153(3): 437–449. DOI: 10.1002/jcp.1041530302

References

1. Hirsch C., Roesslein M., Krug H.F., Wick P. Nanomaterial cell interactions: are current in vitro tests reliable? *Nanomedicine*. 2011; 6(5): 837–847. DOI: 10.2217/nnm.11.88
2. Arora S., Rajwade J.M., Paknikar K.M. Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012; 258(2): 151–165. DOI: 10.1016/j.taap.2011.11.010
3. Pietroiusti A. Health implications of engineered nanomaterials. *Nanoscale*. 2012; 4(4): 1231–1247. DOI: 10.1039/c2nr11688j
4. Faria M., Björnmalm M., Thurecht K.J., Kent S.J., Parton R.G., Kavallaris M., Johnston A.P.R., Gooding J.J., Corrie S.R., Boyd B.J., Thordarson P., Whittaker A.K., Stevens M.M., Prestidge C.A., Porter C.J.H., Parak W.J., Davis T.P., Crampin E.J., Caruso F. Minimum information reporting in bio–nano experimental literature. *Nat. Nanotechnol.* 2018; 13(9): 777–785. DOI: 10.1038/s41565-018-0246-4
5. Faria M., Björnmalm M., Crampin E.J., Caruso F. A few clarifications on MIRIBEL. *Nat. Nanotechnol.* 2020; 15(1): 2–3. DOI: 10.1038/s41565-019-0613-9
6. Rösslein M., Elliott J.T., Salit M., Petersen E.J., Hirsch C., Krug H.F., Wick P. Use of cause-and-effect analysis to design a high-quality nanocytotoxicology assay. *Chem. Res. Toxicol.* 2015; 28(1): 21–30. DOI: 10.1021/tx500327y
7. Kaur J., Tikoo K. Evaluating cell specific cytotoxicity of differentially charged silver nanoparticles. *Food. Chem. Toxicol.* 2013; 51: 1–14. DOI: 10.1016/j.fct.2012.08.044
8. Brkić Ahmed L., Milić M., Pongrac I.M., Marjanović A.M., Mlinarić H., Pavičić I., Gajović S., Vinković Vrček I. Impact of surface functionalization on the uptake mechanism and toxicity effects of silver nanoparticles in HepG2 cells. *Food. Chem. Toxicol.* 2017; 107(Pt A): 349–361. DOI: 10.1016/j.fct.2017.07.016
9. Kaba S.I., Egorova E.M. In vitro studies of the toxic effects of silver nanoparticles on HeLa and U937 cells. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 2015; 8: 19–29. DOI: 10.2147/NSA.S78134
10. Egorova E.M., Kaba S.I., Tlupova S.A. *Assessment of the Cytotoxicity of Silver Nanoparticles with Different Surface Charge*. In: *Advances in Nanotechnology*. Eds.: Bartul Z., Trenor J. New York: Nova Science Publishers; 2016: 25–48.
11. Kaba S.I., Sokolovskaya A.A., Tlupova Z.A., Egorova E.M. [The cytotoxic effects of silver nanoparticles with different surface charge in Jurkat cells]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2016; 14(3): 31–37. (in Russian)
12. Egorova E.M., Kaba S.I. The effect of surfactant micellization on the cytotoxicity of silver nanoparticles stabilized with aerosol-OT. *Toxicol. Vitro*. 2019; 57: 244–254. DOI: 10.1016/j.tiv.2019.03.006
13. Kaba S.I., Egorova E.M. [The contribution of stabilizer to silver nanoparticle cytotoxicity in experiments on endothelial and fibroblast-like cells]. *Rossiyskiye nanotekhnologii [Nanotechnologies in Russia]*. 2020; 15(4): 507–515. DOI: 10.1134/S1995078020040059 (in Russian)
14. Bauer J., Margolis M., Schreiner C., Edgell C.J., Azizkhan J., Lazarowski E., Juliano R.L. In vitro model of angiogenesis using a human endothelium-derived permanent cell line: contributions of induced gene expression, G-proteins, and integrins. *J. Cell. Physiol.* 1992; 153(3): 437–449. DOI: 10.1002/jcp.1041530302

Сведения об авторах

Каба Саид Ибрагимович — научный сотрудник лаборатории нанопатологии и биомедицинских нанотехнологий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0001-5391-6707>

Егорова Елена Михайловна — доктор химических наук, главный научный сотрудник лаборатории нанопатологии и биомедицинских нанотехнологий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»