

УСИЛЕНИЕ ГЕНЕРАЦИИ ГИДРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ ЛЕЙКОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ДИАМИНОВ КАК ПРОЯВЛЕНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ МИКРОБНЫХ МЕТАБОЛИТОВ



А.П. Годовалов, Т.И. Карпунина, И.А. Морозов

ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера Минздрава России, г. Пермь, Россия

Резюме. В последнее время интерес к исследованию роли полиаминов в межклеточных взаимоотношениях, особенно в очаге воспаления, где наблюдается накопление этих поликатионов, увеличивается. Особое внимание в этом плане привлекают продукты микробного происхождения — кадаверин и путресцин. Описана роль полиаминов как «скавенджеров» свободных радикалов, но до сих пор нет данных о их влиянии на радикал-продуцирующую активность лейкоцитов. Цель исследования — изучение особенностей генерации гидроксильных радикалов лейкоцитами человека под влиянием полиаминов микробного происхождения. **Материалы и методы.** Пробы периферической венозной крови были получены от 20 практически здоровых доноров. Для оценки продукции кислородных радикалов проводили реакцию люминол-зависимой хемилюминесценции с лейкоцитами крови, предварительно инкубированными с кадаверином (0,01 М) и путресцином (0,01 М). Измерение проводили на люминометре Luminoskan Ascent® Thermo Labsystems (США) в течение 180 мин. Для статистического анализа использовали интегральный показатель хемилюминесценции за весь период измерения (RLU). **Результаты и обсуждение.** Показано, что кадаверин оказывает стимулирующее влияние на способность лейкоцитов к продукции радикалов (усредненная площадь под кривой $6,7 \pm 0,7$ у.е., $p < 0,05$). Путресцин слабо влиял на радикал-продуцирующую активность клеток человека ($2,8 \pm 0,4$ у.е., $p < 0,05$). Такая ситуация может быть обусловлена непосредственным влиянием поликатионов на механизмы генерации радикалов, а также увеличением активности диаминооксидазы лейкоцитов, которая катализирует превращение диаминов в аминокальдегид, что сопровождается выделением перекиси водорода, вступающей в реакцию с люминолом. Кроме того, фермент инактивирует и другие соединения, такие как гистамин, что приводит к формированию менее выраженной клинической картины. Полиамины, в частности кадаверин и путресцин, можно отнести к факторам ремоделирования метаболической активности лейкоцитов организма-хозяина, что направлено на сохранение жизнеспособности и увеличение численности микроорганизмов. **Заключение.** Таким образом, кадаверин и путресцин, продукция которых осуществляется микроорганизмами в зависимости от условий микроокружения, очевидно, могут рассматриваться в качестве медиаторов, опосредующих мало- или бессимптомное течение воспалительных заболеваний, что способствует реализации персистентного потенциала бактерий.

Ключевые слова: кадаверин, путресцин, лейкоциты, гидроксильные радикалы, хемилюминесценция, микроорганизмы.

Адрес для переписки:

Годовалов Анатолий Петрович
614990, Россия, г. Пермь, ул. Екатерининская, 85,
ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский
университет им. акад. Е.А. Вагнера МЗ РФ.
Тел.: 8 (342) 236-44-85, 8 (912) 981-51-00.
E-mail: AGodovalov@gmail.com

Contacts:

Anatoliy P. Godovalov
614990, Russian Federation, Perm, Ekaterininskaya str., 85,
Perm State Medical University named after academician E.A. Wagner.
Phone: +7 (342) 236-44-85, +7 (912) 981-51-00.
E-mail: AGodovalov@gmail.com

Для цитирования:

Годовалов А.П., Карпунина Т.И., Морозов И.А. Усиление генерации гидроксильных радикалов лейкоцитами человека в присутствии бактериальных диаминов как проявление иммуномодулирующего влияния микробных метаболитов // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 575–579. doi: 10.15789/2220-7619-EHR-1771

Citation:

Godovalov A.P., Karpunina T.I., Morozov I.A. Enhanced hydroxyl radical generation by human leukocytes exposed to bacterial diamines highlighting immunomodulatory effect of microbial metabolites // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 575–579. doi: 10.15789/2220-7619-EHR-1771

© Годовалов А.П., Карпунина Т.И., Морозов И.А., 2022

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-EHR-1771>

ENHANCED HYDROXYL RADICAL GENERATION BY HUMAN LEUKOCYTES EXPOSED TO BACTERIAL DIAMINES HIGHLIGHTING IMMUNOMODULATORY EFFECT OF MICROBIAL METABOLITES

Godovalov A.P., Karpunina T.I., Morozov I.A.

E.A. Vagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Abstract. Recently, there have been increasing an interest to study a role of polyamines in intercellular interactions, especially in the focus of inflammation, where accumulation of such polycations is observed. In this regard, products of microbial origin — cadaverine and putrescine — are of particular attention. The role of polyamines as «scavengers» of free radicals has been described, but no data of their effect on the leukocyte radical-producing activity have been obtained so far. The aim of the investigation was to study features of hydroxyl radical generation by human leukocytes exposed to microbe-derived polyamines. *Materials and methods.* Peripheral venous blood samples were obtained from 20 healthy donors. To assess radical production, a luminol-dependent chemiluminescence reaction was carried out with blood leukocytes pre-incubated with cadaverine (0.01 M) and putrescine (0.01 M), measured on a Luminoskan Ascent® Thermo Labsystems luminometer (USA) for 180 min. For statistical analysis, an integral chemiluminescence index was used for the entire measurement period (RLU). *Results and discussion.* It was shown that cadaverine has a stimulating effect on the leukocyte potential to produce radicals (averaged area under the curve is 6.7 ± 0.7 r.u., $p < 0.05$). Putrescine had little effect on the radical-producing activity of human cells (2.8 ± 0.4 r.u., $p < 0.05$). This might be due to the direct influence of polycations on the mechanisms of radical generation, as well as increased activity of leukocyte diamine oxidase catalyzing the conversion of diamines into aminoaldehyde, which is accompanied by the release of hydrogen peroxide reacting with luminol. In addition, the enzyme inactivates other compounds, such as histamine leading to formation of a less pronounced clinical picture. Polyamines, particularly cadaverine and putrescine, can be referred to the factors remodeling the metabolic activity of the host leukocytes, which is aimed at maintaining the viability and increasing the number of microorganisms. *Conclusion.* Thus, cadaverine and putrescine produced by microorganisms, depending on the conditions of the microenvironment, might be evidently considered as mediators of the mild or asymptomatic course of inflammatory diseases, which contributes to underlying persistent potential of bacteria.

Key words: *cadaverine, putrescine, leukocytes, hydroxyl radicals, chemiluminescence, microorganisms.*

В современной микробиологии наблюдается смена лидирующих тенденций: возбудители острых инфекционных заболеваний отходят на второй план, в то время как этиология и патогенез состояний со стертой клиникой, а тем более бессимптомная инфекция или носительство, оставаясь по сей день относительно малоизученными, привлекают все большее внимание исследователей. Отчасти такие метаморфозы связаны с наращиванием условно патогенной микрофлорой персистентного потенциала. Еще в середине прошлого века сначала Hobby G.L. (1942), а позднее Bigger J.W. обратили внимание на отсутствие полной стерилизации пенициллином культур *Staphylococcus aureus* [7]. Именно Bigger J.W. впервые применил к выжившей субпопуляции бактерий название клетки-персисторы («неделяющиеся, бездействующие клетки») [7]. Однако лишь через несколько десятков лет была осознана значимость проблемы персистенции микроорганизмов [11, 16].

Персистентный потенциал обеспечивается различными приспособительными механизмами, выработанными бактериями в процессе эволюции, и универсален как для патогенов, так и для представителей индигенной микрофлоры [1]. Памятуя о том, что противомикробную защиту в организме человека, наряду с гуморальными факторами, осуществляют иммунокомпетентные клетки [10], логично предположить наличие у персистирующих бактерий метаболитов, оказывающих опреде-

ленное влияние непосредственно на функциональную активность клеточных эффекторов иммунитета.

В последнее время возрастает интерес к исследованию роли полиаминов (ПА) в межклеточных взаимоотношениях, особенно в очаге воспаления, где наблюдается накопление этих поликатионов [14, 19]. Привлекают внимание в этом плане ПА микробного происхождения — кадаверин и путресцин [23]. Показано, что такие факторы, как дефицит питательных веществ, действие антимикробных и других реактантов, которые в очаге воспаления представлены в большом количестве, увеличивает скорость синтеза кадаверина и путресцина *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae* [5, 6, 21]. Описана роль ПА как «скавенджеров» свободных радикалов [13], но до сих пор нет данных об их влиянии на радикал-продуцирующую активность лейкоцитов. Известно, что генерация активных форм кислорода (пероксид водорода, супероксидный анион-радикал, синглетный кислород, гидроксильный радикал, гипохлорид) является ключевым звеном деструкции фагоцитированных объектов [18]. Нарушение этого компонента фагоцитоза приводит к его незавершенности, когда микроорганизмы успешно персистируют в цитоплазме фагоцитов [12, 24].

Цель исследования — изучение особенностей генерации гидроксильных радикалов лейкоцитами человека под влиянием полиаминов микробного происхождения.

Материалы и методы

Пробы периферической венозной крови были получены от 20 практически здоровых доноров. Для оценки продукции гидроксильных радикалов проводили реакцию люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) с лейкоцитами крови [22], выделенными методом седиментации с 0,1% метилцеллюлозой (Sigma-Aldrich, США), с последующей преинкубацией с кадаверином (0,01 М) и путресцином (0,01 М) в течение 60 мин при 37°C. При постановке реакции ЛЗХЛ использовали 2×10^{-4} М натриевой соли люминола (Sigma, США), предварительно обработанные ПА клетки (25×10^6 /мл) и неопсонизированный зимозан (конечные концентрации 15, 150 и 1500 мкг/мл). Измерение проводили на люцинометре Luminoskan Ascent® (Thermo Labsystems, США) в течение 180 мин. Для статистического анализа использовали интегральный показатель хемилюминесценции за весь период измерения (RLU).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета Statistica 7.0.

Для проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро–Уилка. В случае распределения, приближенного к нормальному, использовали t-критерий Стьюдента, в остальных случаях — критерий Манна–Уитни для оценки значимости различий. За пороговый уровень значимости принимали величину $p < 0,05$. Результаты представлены в виде среднего и его ошибки ($M \pm m$).

Результаты и обсуждение

При оценке радикал-продуцирующей функции лейкоцитов показано, что классический стимулятор зимозан оказывал дозозависимое влияние на синтез активных форм кислорода (рис., А). Средняя площадь под кривой, описывающей генерацию радикалов при использовании зимозана в концентрации 15 мг/мл, составила $3,1 \pm 0,4$ у.е., 150 мг/мл — $5,5 \pm 1,2$ у.е. ($p = 0,05$) и 1500 мг/мл — $9,1 \pm 1,3$ у.е. ($p < 0,05$ к концентрации 15 и 150 мг/мл).

Преинкубация клеток с ПА оказывала неоднозначное действие на способность лейко-

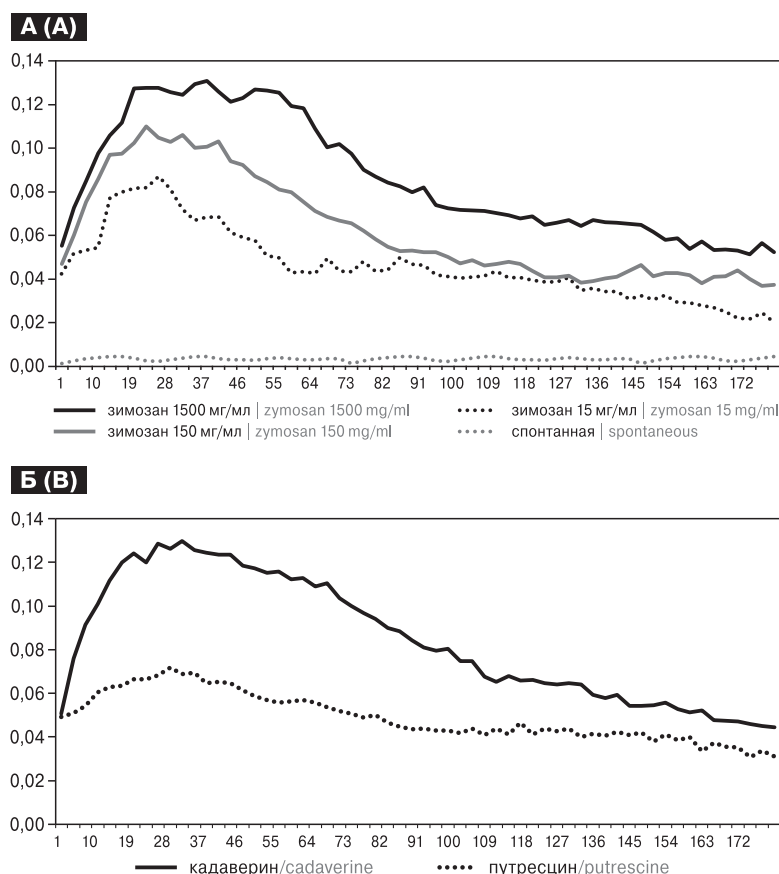


Рисунок. Влияние зимозана (А), кадаверина и путресцина (Б) на радикал-продуцирующую активность лейкоцитов

Figure. Zymosan (A), cadaverine and putrescine (B) affecting leukocyte radical-production activity

Примечание. По оси ординат — интегральный показатель хемилюминесценции за весь период измерения (RLU), по оси абсцисс — минуты.

Note. Y-axis: integral chemiluminescence index for the entire measurement period (RLU), x-axis: duration (minutes).

цитов к продукции радикалов. Так, действие кадаверина сопоставимо с таковым при максимальной концентрации зимозана (рис., Б). Усредненная площадь под кривой составила $6,7 \pm 0,7$ у.е. ($p < 0,05$ к пробам с зимозаном в концентрации 15 мг/мл). В противоположность этому, после предобработки клеток путресцином максимальный уровень радикал-продуцирующей активности не достигал такового при минимальной концентрации зимозана (рис., Б). Площадь под кривой в пробах лейкоцитов, предобработанных путресцином — $2,8 \pm 0,4$ у.е. ($p < 0,05$ к пробам с зимозаном в концентрации 150 и 1500 мг/мл).

Синтез полиаминов бактериальными клетками в очаге воспаления необходим по ряду причин и основная среди них — защита от активных форм кислорода, которые в большом количестве продуцируются лейкоцитами. В такой ситуации логично предположить повышение уровня полиаминов микробного происхождения в очаге, что было зарегистрировано нами ранее [2, 4]. Кроме этого нами показано влияние путресцина и кадаверина на поглотительную активность нейтрофилов и моноцитов [3]. На этом фоне выявленное в настоящем исследовании увеличение продукции радикалов предобработанными нейтрофилами и моноцитами кажется парадоксальным, но среди причин такой ситуации можно рассматривать и непосредственное влияние поликатионов на механизмы генерации радикалов [18], и активность диаминооксидазы лейкоцитов. Этот фермент катализирует превращение диаминов в аминокальдегид, что сопровождается выделением перекиси водорода, которая взаимодействует с люминолом [20], присутствующим в реакционной смеси. Повышение активности диаминооксидазы при активации лейкоцитов является закономерным феноменом. В исследова-

ниях Nouen G. и соавт. [15] показано, что активность диаминооксидазы увеличивается практически сразу после активации фагоцитирующих клеток. При этом фермент выполняет антимедиаторную противовоспалительную функцию, инактивируя гистамин и другие диамины, в том числе кадаверин и путресцин [9]. Такая ситуация является благоприятной для микроорганизмов, когда их структуры защищены избытком полиаминов и они в свою очередь активируют антимедиаторный фермент, результатом деятельности которого в итоге будет снижение активности воспаления [8, 25], что и было прослежено нами в исследованиях *in vivo* [2].

Различия в степени воздействия кадаверина и путресцина возможно связаны с разными механизмами их влияния на фагоцитирующие клетки. Путресцин — исходное соединение для синтеза двух физиологически активных полиаминов — спермидина и спермина [17], которые могут оказывать ингибирующее влияние на генерацию кислородсодержащих продуктов.

Заключение

Таким образом, предложенная нами ранее гипотеза о том, что ПА представляют собой рецептор-независимый фактор микробной агрессии [3], с одной стороны, благодаря полученным результатам, находит свое подтверждение, но в то же время прослеживается полифункциональность этих соединений. Кадаверин и путресцин, продукция которых осуществляется микроорганизмами в зависимости от условий микроокружения, очевидно, можно рассматривать в качестве медиаторов, опосредующих мало- или бессимптомное течение воспалительных заболеваний, что способствует реализации персистентного потенциала бактерий.

Список литературы/References

1. Бухарин О.В. Адаптивные стратегии взаимодействия возбудителя и хозяина при инфекции // Вестник Российской академии наук. 2018. Т. 88, № 7. С. 637–643. [Bukharin O.V. Adaptive strategies for the interaction of the pathogen and the host during infection. *Vestnik Rossijskoj akademii nauk = Bulletin of the Russian Academy of Sciences*, 2018, vol. 88, no. 7, pp. 637–643. (In Russ.)] doi: 10.31857/S086958730000087-3
2. Годовалов А.П., Даниелян Т.Ю., Карпунина Т.И., Вавилов Н.В. Опыт изучения микрофлоры и белков эякулята при разной эхоскопической картине предстательной железы // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 347–353. [Godovalov A.P., Danielyan T.Yu., Karpunina T.I., Vavilov N.V. Experience in studying the microflora and proteins of ejaculate with different echoscopic picture of the prostate gland. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 347–353. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-347-353
3. Годовалов А.П., Карпунина Т.И., Нестерова Л.Ю., Морозов И.А. Полиамины как рецептор-независимые факторы агрессии условно-патогенных микроорганизмов // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2019. № 3. С. 91–94. [Godovalov A.P., Karpunina T.I., Nesterova L.Yu., Morozov I.A. Polyamines as receptor-independent factors of aggression of opportunistic microorganisms. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2019, no. 3, pp. 91–94. (In Russ.)] doi: 10.14427/jipai.2019.3.91
4. Морозов И.А., Карпунина Т.И., Годовалов А.П. Кадаверин как регулятор активности про- и эукариотических клеток // Аллергология и иммунология. 2018. Т. 19, № 3. С. 149–150. [Morozov I.A., Karpunina T.I., Godovalov A.P. Cadaverine as a regulator of the activity of pro- and eukaryotic cells. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2018, vol. 19, no. 3, pp. 149–150. (In Russ.)]

5. Нестерова Л.Ю., Негорелова Е.В., Ткаченко А.Г. Биогенные полиамины как модуляторы активности Quorum sensing системы и биопленкообразования *Vibrio harveyi* // Вестник Пермского университета. Серия «Биология». 2019. № 3. С. 300–308. [Nesterova L.Yu., Negorelova E.V., Tkachenko A.G. Biogenic polyamines as modulators of the activity of the Quorum sensing system and biofilm formation of *Vibrio harveyi*. *Vestnik Permskogo universiteta. Seriya "Biologiya" = Bulletin of Perm University. Biology Series*, 2019, no. 3, pp. 300–308. (In Russ.)] doi: 10.17072/1994-9952-2019-3-300-308
6. Ткаченко А.Г. Стрессорные ответы бактериальных клеток как механизм развития толерантности к антибиотикам // Прикладная биохимия и микробиология. 2018. Т. 54, № 2. С. 110–133. [Tkachenko A.G. Stress responses of bacterial cells as a mechanism for the development of tolerance to antibiotics. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*, 2018, vol. 54, no. 2, pp. 110–133. (In Russ.)] doi: 10.7868/S0555109918020022
7. Bigger J.W. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization. *Lancet*, 1944, vol. 244, no. 6320, pp. 497–500. doi: 10.1016/S0140-6736(00)74210-3
8. Brown S.P., Cornforth D.M., Mideo N. Evolution of virulence in opportunistic pathogens: generalism, plasticity, and control. *Trends Microbiol.*, 2012, vol. 20, no. 7, pp. 336–342. doi: 10.1016/j.tim.2012.04.005
9. Equi A.M., Brown A.M., Cooper A., Her S.K., Watson A.B., Robins D.J. Oxidation of putrescine and cadaverine derivatives by diamine oxidases. *Tetrahedron*, 1991, vol. 47, no. 3, pp. 507–518. doi: 10.1016/S0040-4020(01)90506-X
10. Ferguson J.S., Weis J.J., Martin J.L., Schlesinger L.S. Complement protein C3 binding to mycobacterium tuberculosis is initiated by the classical pathway in human bronchoalveolar lavage fluid. *Infect. Immun.*, 2004, vol. 72, no. 5, pp. 2564–2573. doi: 10.1128/IAI.72.5.2564-2573.2004
11. Fisher R.A., Gollan B., Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2017, vol. 15, no. 8, pp. 453–464. doi: 10.1038/nrmicro.2017.42
12. Flannagan R.S., Jaumouillé V., Grinstein S. The cell biology of phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol.*, 2012, no. 7, pp. 61–98. doi: 10.1146/annurev-pathol-011811-132445
13. Fujisawa S., Kadoma Y. Kinetic evaluation of polyamines as radical scavengers. *Anticancer Res.*, 2005, vol. 25, no. 2A, pp. 965–969.
14. Hesterberg R.S., Cleveland J.L., Epling-Burnette P.K. Role of polyamines in immune cell functions. *Med. Sci. (Basel)*, 2018, vol. 6, no. 1: 22. doi: 10.3390/medsci6010022
15. Houen G., Högdall E.V., Barkholt V., Nørskov L. Lactoferrin: similarity to diamine oxidase and purification by aminohexyl affinity chromatography. *Eur. J. Biochem.*, 1996, vol. 241, no. 1, pp. 303–308. doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.0303t.x
16. Huemer M., Mairpady Shambat S., Brugger S.D., Zinkernagel A.S. Antibiotic resistance and persistence-implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Rep.*, 2020, vol. 21, no. 12: e51034. doi: 10.15252/embr.202051034
17. Igarashi K., Kashiwagi K. Characterization of genes for polyamine modulon. *Methods Mol. Biol.*, 2011, no. 720, pp. 51–65. doi: 10.1007/978-1-61779-034-8_3
18. Janeway C.A. Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, 2002, vol. 20, pp. 197–216. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359
19. Lohinai Z., Keremi B., Szoko E., Tabi T., Szabo C., Tulassay Z., Levine M. Bacterial lysine decarboxylase influences human dental biofilm lysine content, biofilm accumulation, and subclinical gingival inflammation. *J. Periodontol.*, 2012, vol. 83, no. 8, pp. 1048–1056. doi: 10.1902/jop.2011.110474
20. Mei Y., Ran L., Ying X., Yuan Z., Xin S. A sequential injection analysis/chemiluminescent plant tissue-based biosensor system for the determination of diamine. *Biosens Bioelectron.*, 2007, vol. 22, no. 6, pp. 871–876. doi: 10.1016/j.bios.2006.03.003
21. Shah P., Swiatlo E. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.*, 2008, vol. 68, no. 1, pp. 4–16. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06126.x.
22. Shilov J.I., Orlova E.G. Role of adrenergic mechanisms in regulation of phagocytic cell functions in acute stress response. *Immunology Letters*, 2003, no. 86, pp. 229–233. doi: 10.1016/S0165-2478(03)00027-0
23. Tabor C.W., Tabor H. Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.*, 1985, vol. 49, no. 1, pp. 81–99. doi: 10.1128/mr.49.1.81-99.1985
24. Teng T.-S., Ji A., Ji X.-Y., Li Y.-Z. Neutrophils and immunity: from bactericidal action to being conquered. *J. Immunol. Res.*, 2017, vol. 2017: 9671604. doi: 10.1155/2017/9671604
25. Uribe-Querol E., Rosales C. Control of phagocytosis by microbial pathogens. *Front. Immunol.*, 2017, no. 8: 1368. doi: 10.3389/fimmu.2017.01368

Авторы:

Годовалов А.П., к.м.н., ведущий научный сотрудник ЦНИЛ, доцент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера МЗ РФ, г. Пермь, Россия;
Карпунина Т.И., д.б.н., профессор, профессор кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера МЗ РФ, г. Пермь, Россия;
Морозов И.А., студент лечебного факультета ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера МЗ РФ, г. Пермь, Россия.

Authors:

Godovalov A.P., PhD (Medicine), Leading Researcher of the Central Scientific Laboratory; Associate Professor, Department of Microbiology and Virology, Perm State Medical University named after academician E.A. Wagner, Perm, Russian Federation;
Karpunina T.I., PhD, MD (Biology), Professor, Professor of the Department of Microbiology and Virology, Perm State Medical University named after academician E.A. Wagner, Perm, Russian Federation;
Morozov I.A., Student of Medical Faculty, Perm State Medical University named after academician E.A. Wagner, Perm, Russian Federation.

Поступила в редакцию 18.07.2021
 Принята к печати 28.02.2022

Received 18.07.2021
 Accepted 28.02.2022