

Е. С. Заколюкина<sup>1</sup>, В. М. Чучков<sup>1</sup>, Т. Н. Сергеева<sup>1</sup>, О. А. Вежеева<sup>1</sup>, В. Г. Сергеев<sup>1, 2</sup>

## ВОЗРАСТНЫЕ РАЗЛИЧИЯ ЛПС-ИНДУЦИРОВАННОЙ ЭКСПРЕССИИ BDNF И iNOS В ЧЕРНОЙ СУБСТАНЦИИ КРЫС

<sup>1</sup> Кафедра физиологии, клеточной биологии и биотехнологии (зав. — д-р биол. наук В. Г. Сергеев), ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»; <sup>2</sup> учебно-экспериментальная лаборатория (зав. — д-р биол. наук В. Г. Сергеев) ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия», г. Ижевск

**Цель** — исследовать интенсивность экспрессии нейротрофического фактора мозга (Brain-Derived Neurotrophic factor — BDNF) и индуцибельной нитроксидсинтазы (iNOS) глиальными клетками черного вещества мозга крыс разного возраста в норме и в условиях нейровоспаления.

**Материал и методы.** Эксперименты проведены на 36 самцах крыс линии Вистар 18 молодых животных с массой тела 250–300 г и 18 старых животных с массой тела 380–420 г. Иммуногистохимическим методом указанные маркеры выявляли на криостатных срезах в астро- и микроглиоцитах черного вещества через 8 нед после стереотаксического унилатерального введения в эту область липополисахарида (ЛПС).

**Результаты.** Обнаружено достоверное превышение количества GFAP- и CD11β-позитивных клеток (астро- и микроглиоцитов соответственно) в черном веществе мозга старых крыс. Через 8 нед после введения эндотоксина обнаружены возраст-зависимые различия в ЛПС-индуцированной выработке BDNF и iNOS. Введение ЛПС интенсифицировало производство BDNF в астроцитах у молодых, но не старых животных, в то же самое время микроглиоциты старых животных значительно интенсивней экспрессировали iNOS.

**Выводы.** Баланс трофических и повреждающих факторов, синтезируемых глиальными клетками черного вещества среднего мозга в ответ на эндотоксиновую стимуляцию, зависит от возраста. Глиальная реакция на эндотоксин у молодых животных имеет защитный характер, а у старых животных она повышает риск окислительного повреждения нейронов.

**Ключевые слова:** микроглиоциты, астроглиоциты, нейровоспаление, BDNF, iNOS

Нейродегенеративные заболевания, манифестирующие в пожилом возрасте, такие как болезнь Альцгеймера или болезнь Паркинсона, сопровождаются хроническим нейровоспалением, морфологическим проявлением которого служит выраженный микро- и астроглиоз [11, 14]. При обсуждении вовлеченности микро- и астроглии в патофизиологические механизмы нейродегенеративных заболеваний исследователи сталкиваются с трудностями в интерпретации данных о способности активированной глии синтезировать как про-, так и противовоспалительные факторы [3, 4]. Так, например, микроглиоциты и астроциты продуцируют нейротрофический фактор головного мозга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) в условиях необходимости трофической поддержки поврежденных или активированных клеток [6, 12, 13]. Однако те же самые глиальные клетки в патологических условиях могут синтезировать провоспалительные цитокины и ферменты, вовлеченные в произ-

водство свободнорадикальных производных кислорода и азота, которые, в свою очередь, оказывают окислительное повреждение нейронов [10]. К примеру, индуцибельная нитроксидсинтаза (iNOS), синтезирующая свободнорадикальный монооксид азота, в норме в мозгу не обнаруживается, но под действием провоспалительных агентов, таких как липополисахарид (ЛПС), начинает экспрессироваться в микроглиоцитах и астроцитах в значительных количествах [8].

Важно отметить, что в черном веществе мозга у пациентов с болезнью Паркинсона, где локализуются гибнущие дофаминергические нейроны, снижены как транскрипция гена, кодирующего BDNF, так и продукция самого белка [7], а в эксперименте на крысах с функциональным исключением синтеза BDNF в области черного вещества воспроизводятся основные проявления классической модели паркинсоноподобной нейродегенерации [9]. Так же, как у пациентов с болезнью Паркинсона, у мышей в моде-

### Сведения об авторах:

Заколюкина Елена Сергеевна (e-mail: [alena-immun@yandex.ru](mailto:alena-immun@yandex.ru)), Чучков Виктор Михайлович (e-mail: [chuchkov.vm@obr18.ru](mailto:chuchkov.vm@obr18.ru)), Сергеева Татьяна Николаевна (e-mail: [tnbio@ya.ru](mailto:tnbio@ya.ru)), Вежеева Ольга Александровна (e-mail: [promo-olga@ya.ru](mailto:promo-olga@ya.ru)), Сергеев Валерий Георгиевич (e-mail: [cellbio@yandex.ru](mailto:cellbio@yandex.ru)), кафедра физиологии, клеточной биологии и биотехнологии, ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», 426034, г. Ижевск, ул. Университетская, 1 (корп. 1)

ли МРТР-индуцированного паркинсонподобного состояния [5] отмечается повышенная экспрессия iNOS. Примечательно, что у мышей с нокаутом гена, кодирующего iNOS, гибель дофаминергических нейронов в этой модели значительно снижена [15].

Для объяснения парадоксального факта о том, что микро- и астроглиоциты способны синтезировать противоположные по биологическому действию факторы, ранее было выдвинуто предположение о том, что в зависимости от силы и длительности действия повреждающих агентов в глиоцитах происходит последовательная смена профиля синтезируемых цитокинов и ферментов с противо- на провоспалительные, что, в конечном итоге, ведет к смене «репаративной» стадии нейровоспаления на «деструктивную» [1]. Тот факт, что большинство нейродегенеративных заболеваний манифестируют в старости, позволяет предположить, что с возрастом в нервной ткани увеличивается количество сенсibilизированных глиальных клеток, которые под воздействием повреждающих агентов форсированно приобретают провоспалительный статус, что, в конечном итоге, ускоряет процесс нейродегенерации.

Для проверки данного предположения мы провели эксперимент, в котором исследовали выраженность экспрессии BDNF и iNOS глиальными клетками черного вещества мозга крыс разного возраста в норме и условиях нейровоспаления, которое моделировали стереотаксическим введением в исследуемую область бактериального ЛПС. При помощи иммуногистохимического метода описывали изменение количества микро- и астроглиоцитов, а также интенсивности свечения иммунореактивных BDNF и iNOS в области черного вещества.

**Материал и методы.** Исследование выполнено на 36 самцах крыс линии Вистар (18 молодых животных с массой тела 250–300 г и 18 старых животных с массой тела 380–420 г), содержащихся в стандартных условиях (12-часовой световой день, свободный доступ к пище и воде) с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г., Хельсинкской декларацией 1975 г. и ее пересмотренным вариантом 2000 г. На данное исследование получено разрешение локального комитета по биомедицинской этике (№ 545/1 от 23.05.2017 г.). Молодых и старых животных поделили на две группы (контрольная и экспериментальная) по 9 особей в каждой. Молодым и старым животным экспериментальных групп вводили при помощи стереотаксической установки 2 мкл раствора ЛПС (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 0,01 мкл/мл в область черного вещества правой стороны мозга по следующим координатам: 5,2 мм — каудальной брегмы, 2,0 мм — латеральной осевой шва, на глубину 7,2 мм относительно твердой мозговой оболочки. Крысам контрольных групп обоего возраста анало-

гичным способом вводили 2 мкл стерильного изотонического раствора хлорида натрия.

Через 8 нед животным проводили транскардиальную перфузию 4 % параформальдегидом, извлекали мозг для иммуногистохимического исследования и выдерживали в 20 % растворе сахарозы. Криостатные срезы мозга толщиной 14 мкм окрашивали с использованием антител к BDNF (мышинные IgG, 1:500; Chemicon, Канада), iNOS (мышинные IgG, 1:500; Sigma-Aldrich, США), глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP) (кроличьи IgG, 1:400; Santa Cruse, США) и CD11 $\beta$  (кроличьи IgG, 1:400; Santa Cruse, США). Для двойного иммунофлюоресцентного окрашивания использовали смесь вторых антител, конъюгированных с FITC (антикроличьи IgG 1:500; Sigma-Aldrich, США) и TRITC (антимышинные IgG 1:500; Sigma-Aldrich, США).

Подсчет количества глиальных клеток в черном веществе и измерение суммарной интенсивности свечения иммунореактивного продукта в границах этой области производили при помощи компьютерной программы ImagePro Insight 7.0 (Media cybernetics, США). Обсчитывался каждый восьмой срез черного вещества на всем его протяжении как на стороне введения исследуемых веществ, так и на контралатеральной (контрольной). Результат подсчета представляли в процентном выражении относительно контроля, количество исследуемых клеток в котором принималось за 100 %.

Статистический анализ данных проводили в компьютерной программе Statistica 10.0. Результаты исследований проверяли на нормальность распределения значений с помощью W-теста Шапиро—Вилкоксона. Различия в количестве клеток и интенсивности экспрессии иммунореактивного сигнала между группами животных анализировали при помощи метода однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Различия считали достоверными при уровне статистической значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования.** Иммуногистохимическое исследование черного вещества мозга молодых и старых крыс продемонстрировало значительные отличия между ними в количестве микро- и астроглиоцитов и интенсивности экспрессии ими, соответственно, CD11 $\beta$ - и GFAP-иммунореактивного продукта как в контроле, так и после введения ЛПС.

Микроглиоциты черной субстанции молодых животных характеризовались низким ветвлением отростков, незначительной площадью клеточных тел и низкой экспрессией иммунореактивного CD11 $\beta$  (рис. 1, а). У старых животных отмечалось увеличенное количество клеток (на  $48,4 \pm 12,1$  %,  $p < 0,05$ ) и их площади, а также более высокая интенсивность свечения иммунореактивного CD11 $\beta$  (превышение на  $52,3 \pm 16,8$  %,  $p < 0,05$  относительно молодых животных; см. рис. 1, в).

Астроглия, выявляемая в черном веществе мозга молодых животных контрольной группы после окрашивания антителами к GFAP, имела вид слабоокрашенных, звездчатых по форме клеток с тонкими отростками, которые в ряде случаев оконтуривали кровеносные сосуды (рис. 2, а). Нервная ткань черного

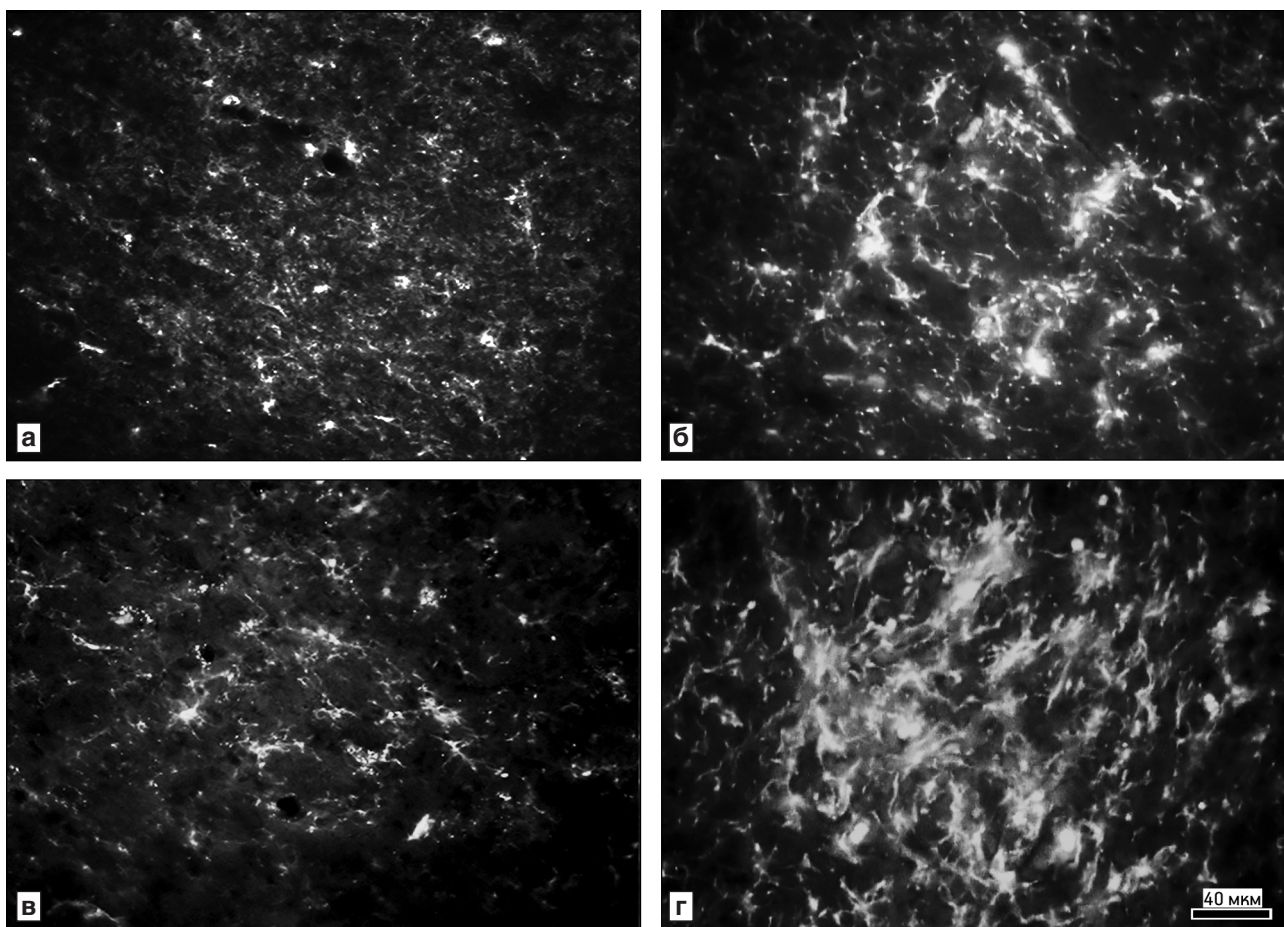


Рис. 1. Экспрессия иммунореактивного CD11b в черной субстанции молодых и старых крыс в контроле и через 8 нед после унилатерального введения липополисахарида (ЛПС).

а — контрольные молодые животные; б — молодые животные с введенным ЛПС; в — контрольные старые животные; г — старые животные с введенным ЛПС

вещества мозга старых животных характеризовалась по сравнению с молодыми более интенсивным свечением иммунореактивного GFAP (превышение на  $67,9 \pm 34,9\%$ ,  $p < 0,05$ ), главным образом за счет увеличения площади астроцитарных тел и толщины их отростков (см. рис. 2, в). Значительно чаще по сравнению с молодыми животными вокруг кровеносных сосудов наблюдалась хорошо видимая «муфта» из астроглиальных окончаний.

Через 8 нед после однократной инъекции ЛПС в область черного вещества животным разного возраста наблюдались однонаправленные изменения в количестве клеток, площади тел и отростков, а также интенсивности экспрессии иммунореактивных маркеров, которые, однако, значительно различались по степени их проявления у молодых и старых крыс. Введение ЛПС молодым животным приводило к достоверному увеличению количества CD11 $\beta$ -позитивных клеток (микроглиоцитов) и GFAP-позитивных клеток (астроглиоцитов) относительно контроля на  $197,8 \pm 24,6$  и  $165,2 \pm 31,2\%$  соответственно (см.

рис. 1, б; 2, б). Введение ЛПС старым животным вызывало более выраженное количественное увеличение глиальных клеток относительно контроля ( $256,6 \pm 38,2\%$  — для микроглиоцитов и  $295,4 \pm 38,8\%$  — для астроглиоцитов).

Интенсивность экспрессии BDNF и iNOS в черном веществе через 8 нед после инъекции в нее ЛПС также демонстрировала ярко выраженную зависимость от возраста животного. Если в контроле как у молодых, так и у старых животных экспрессия BDNF была незначительной и обнаруживалась, главным образом, в редких клеточных отростках (рис. 3, а, в), то введение ЛПС приводило к радикальному усилению продукции этого трофического фактора у молодых (на  $246,4 \pm 24,4\%$ ,  $p < 0,001$ ), но не старых животных. Интенсивно светящийся иммунореактивный продукт у молодых крыс выявлялся в большом количестве в отростках и клеточных телах, структура которых была сходной с астроцитарной (см. рис. 3, б). Одиночные BDNF-позитивные клетки у старых животных, как правило, локализовались вблизи кровеносных сосудов (см. рис. 3, г).

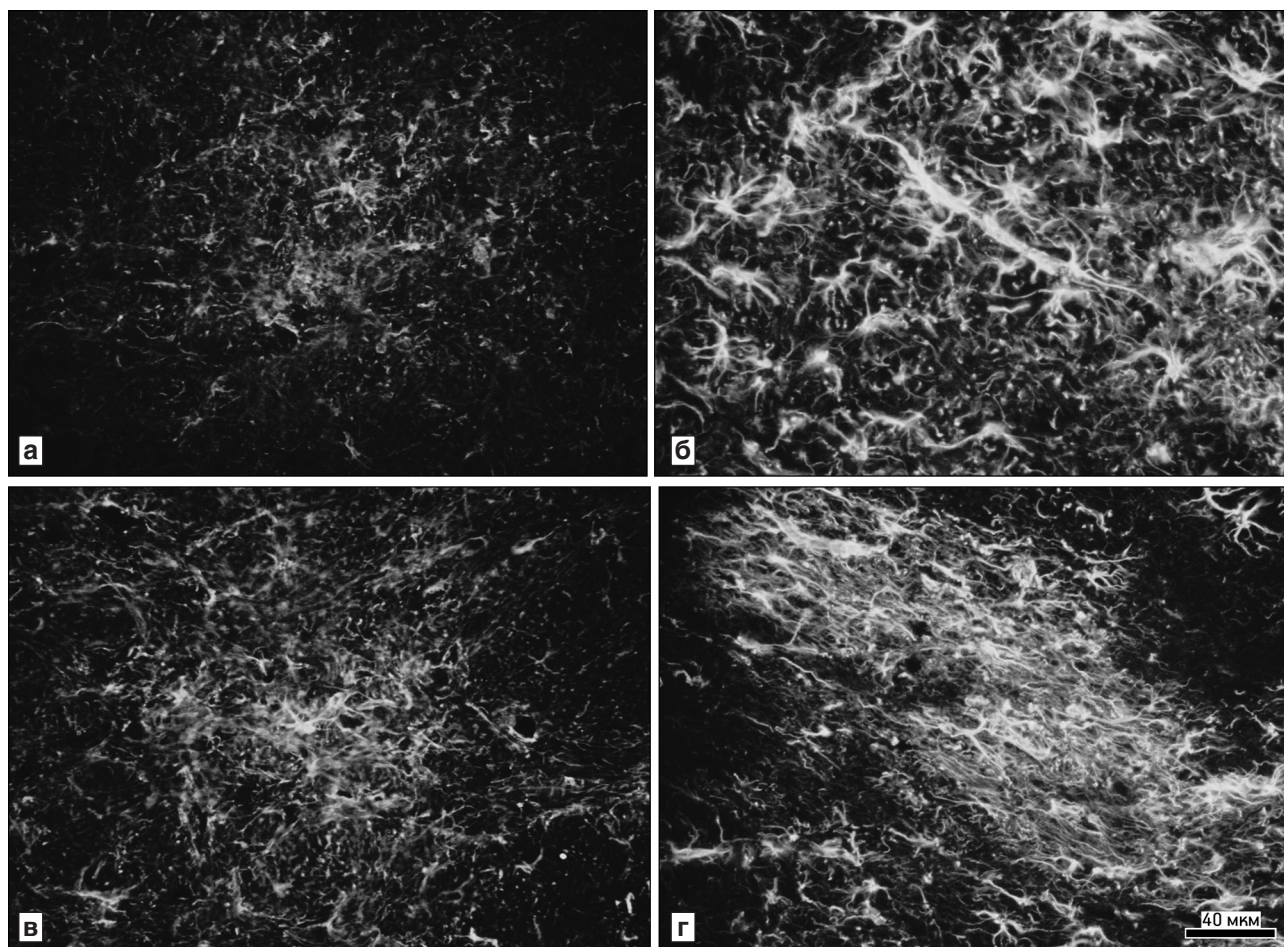


Рис. 2. Экспрессия иммунореактивного GFAP в черной субстанции молодых и старых крыс в контроле и через 8 нед после введения липополисахарида (ЛПС).

а — контрольные молодые животные; б — молодые животные с введенным ЛПС; в — контрольные старые животные; г — старые животные с введенным ЛПС

В то же время, увеличение интенсивности экспрессии iNOS в черном веществе после введения ЛПС молодым животным было заметно меньше по сравнению с таковым у старых животных. Рост экспрессии относительно контроля у молодых составил  $147,5 \pm 22,3\%$ , в то время как у старых достигал  $267,4 \pm 28,6\%$  (рис. 4, б, г).

В исследованиях с двойной иммуногистохимической окраской срезов мы предприняли попытку идентифицировать тип глиальных клеток, реактивно меняющих продукцию BDNF и iNOS в ответ на введение ЛПС. Одновременное окрашивание антителами к CD11 $\beta$  (маркер микроглиоцитов) и BDNF не выявило выраженной солокализации экспрессируемых маркеров в изученных группах, т.е. микроглия не являлась основным продуцентом ростового фактора. Двойное окрашивание на BDNF и GFAP в подавляющем количестве случаев демонстрировало солокализацию этих меток, что свидетельствовало о ведущей роли астроглии в продукции нейротрофического фактора в условиях индуцированного нейровос-

паления. Интересным представляется тот факт, что в части астроцитов черного вещества мозга как у молодых, так и у старых животных введение ЛПС вызывало умеренное усиление продукции iNOS, однако наиболее выраженным продуцентом иммунореактивного сигнала были микроглиоциты старых животных.

**Обсуждение полученных данных.** Сравнительный анализ состояния глиальных клеток черного вещества молодых и старых животных позволяет сделать вывод о том, что с возрастом в нервной ткани исследуемой области растет число активированных микро- и астроглиоцитов. Это свидетельствует о развитии в ней, даже в условиях нормы, реактивного процесса, сходного с хроническим нейровоспалением.

Введение провоцирующего агента (бактериального эндотоксина) в область черного вещества вызывает количественное увеличение микро- и астроглиоцитов как у молодых, так и старых животных, однако соотношение продуцируе-

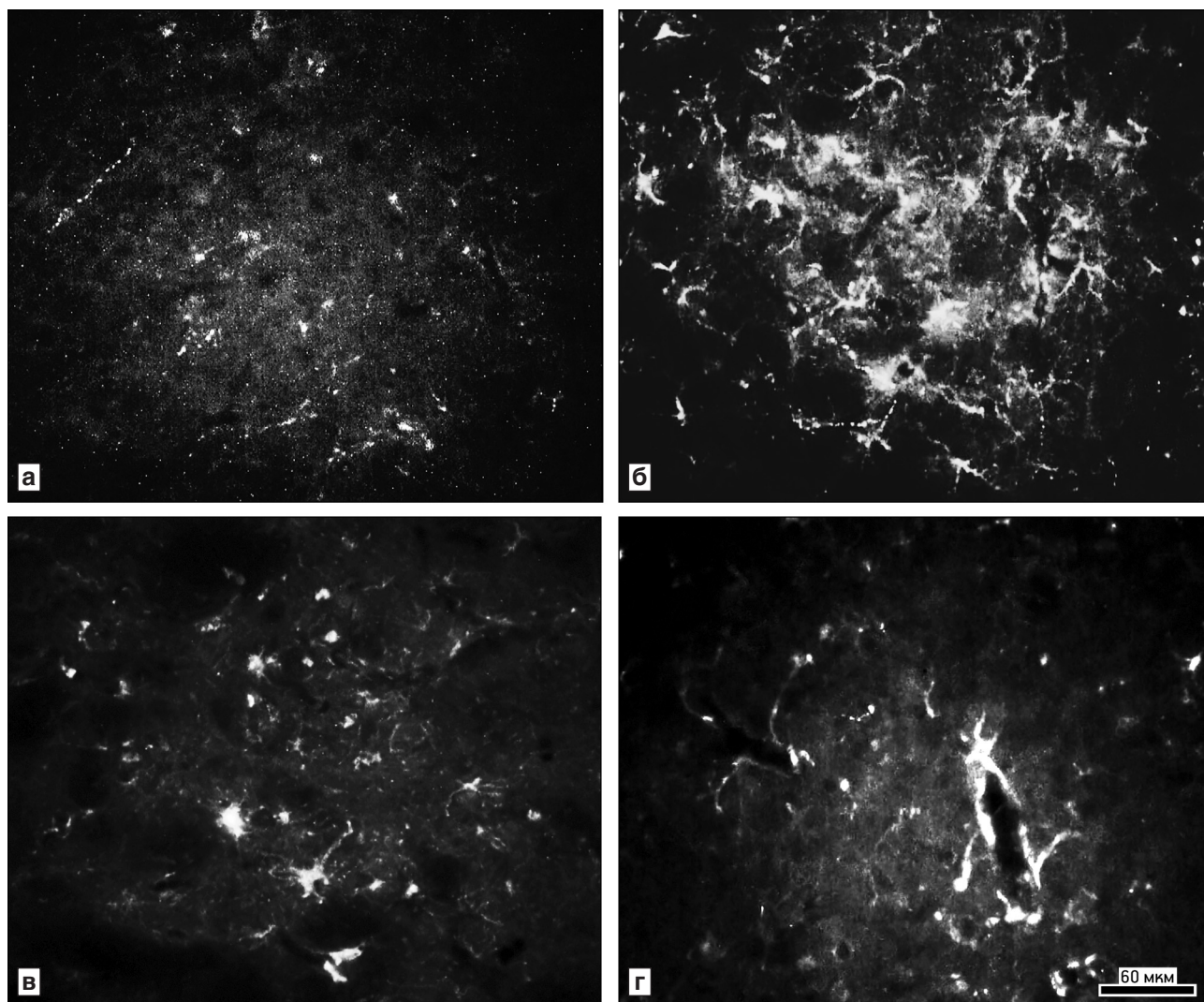


Рис. 3. Экспрессия иммунореактивного BDNF в черной субстанции молодых и старых крыс в контроле и через 8 нед после введения липополисахарида (ЛПС).

а — контрольные молодые животные; б — молодые животные с введенным ЛПС; в — контрольные старые животные; г — старые животные с введенным ЛПС

мых глий «репаративных» и «деструктивных» факторов между этими группами оказывается различным. Введение ЛПС интенсифицирует производство BDNF в астроцитах у молодых, но не старых животных, что может свидетельствовать о значительной активности протективных механизмов нервной ткани у молодых животных в условиях индуцированного нейровоспаления. В то же самое время микроглиоциты старых животных в этих же экспериментальных условиях гораздо интенсивней экспрессируют фермент, участвующий в синтезе свободнорадикального монооксида азота, вызывающего, как известно, окислительное повреждение нейрональных структур.

Таким образом, можно видеть, что нейровоспалительная реакция у молодых животных на эндотоксиновую стимуляцию имеет, в боль-

шей степени, протективный характер, тогда как у старых животных баланс между противои провоспалительными факторами, синтезируемыми в этих условиях, смещен в пользу последних. Логично полагать, что обнаруженные возрастзависимые особенности глиальных реакций повышают риск деструкции нейронов и при воздействии дополнительных повреждающих факторов могут ускорить развитие нейродегенеративного заболевания.

Остается открытым вопрос о причинах обнаруженных различий в характере нейровоспалительных реакций между молодыми и старыми животными. Однако тот факт, что в нервной ткани старых животных даже без предъявления экспериментального воздействия обнаруживаются признаки нейровоспаления, позволяет предположить, что переживаемые в ходе инди-

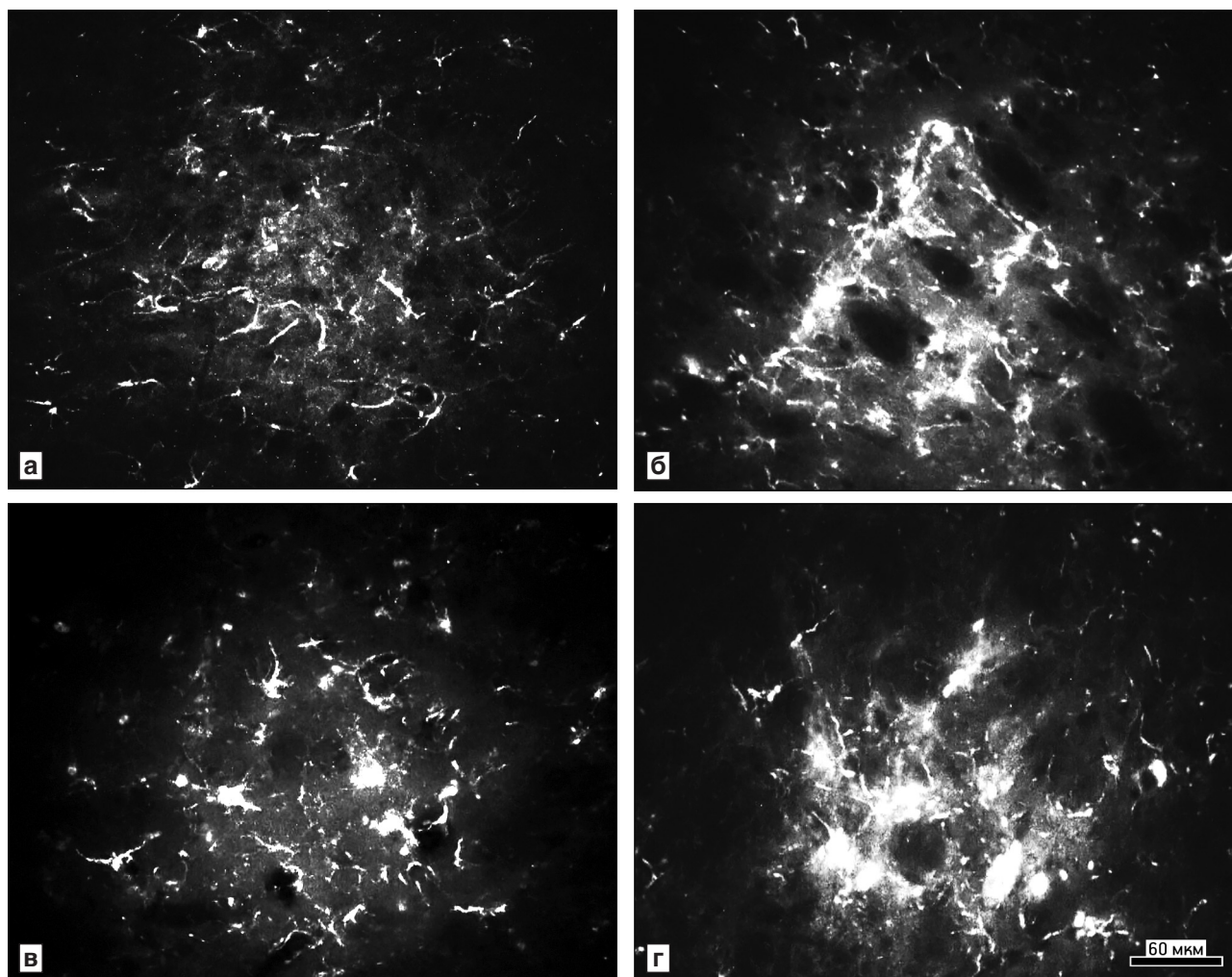


Рис. 4. Экспрессия иммунореактивной iNOS в черной субстанции молодых и старых крыс в контроле и через 8 нед после введения липополисахарида (ЛПС).

а — контрольные молодые животные; б — молодые животные с введенным ЛПС; в — контрольные старые животные; г — старые животные с введенным ЛПС

видуальной жизни неизбежные эксцессы транзиторной активации глии в ответ на действие внешних и внутренних факторов (стресс, интоксикации, агенты бактериальной и вирусной природы и др.) не нивелируются полностью, а остаются в виде персистирующего воспаления низкой интенсивности.

В основе такого явления может лежать описанная нами ранее особенность функциональных взаимодействий между клеточными элементами внутри нейроглиоваскулярных модулей — локальных микросистем нервной системы, представленных нейронами, микроглиями, астроцитами, перицитами и эндотелиоцитами. Наличие значительного числа прямых и обратных связей между этими клетками может обеспечить циркуляцию в них провоспалительной активности, т. е. сохранение персистирующего воспаления даже после однократной стимуляции [2]. Логично полагать, что дополнительные провоцирующие воздействия

на эту «сенситизированную» систему могут облегчить форсированный переход активированных микроглиями из «репаративного» состояния в «деструктивное» и интенсифицировать процесс нейродегенерации.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 15-04-08019-а.*

#### Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: В. Г. С.

Анализ и интерпретация данных: В. М. Ч.

Статистическая обработка материала: Т. Н. С.

Сбор и обработка материала: Е. С. З., О. А. В., Т. Н. С.

Написание текста: В. Г. С.

**Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.**

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Заколюкина Е.С., Тукмачева К.А., Сергеев В.Г. Дозозависимый эффект ЛПС-индуцированной экспрессии BDNF в черной субстанции мозга крыс // Вестн. Удмуртск. ун-та.

- Сер. Биология. Науки о Земле. 2017. Т. 27, вып. 1. С. 80–86 [Zakolyukina E. S., Tukmacheva K. A., Sergeev V. G. LPS dose-dependent expression of BDNF in the rat substantia nigra // *Vestnik Udmurtskogo universiteta. Seriya Biologiya. Nauki o Zemle*. 2017. Vol. 27, № 1. P. 80–86. In Russ.].
2. Сергеева Т. Н., Сергеев В. Г., Чучков В. М. Клеточные механизмы хронического нейровоспаления // *Морфологические ведомости*. 2014. № 4. С. 31–36 [Sergeeva T. N., Sergeev V. G., Chuchkov V. M. Cell mechanisms of chronic neuroinflammation // *Morfologicheskie vedomosti*. 2014. № 4. P. 31–36. In Russ.].
  3. Cardile V., Pavone A., Gulino R. et al. Expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in rat astrocyte cultures treated with Levetiracetam // *Brain Res*. 2003. Vol. 976, № 2. P. 227–233.
  4. Kettenmann H., Hanisch U. K., Noda M., Verkhratsky A. Physiology of microglia // *Physiol. Rev*. 2011. Vol. 91, № 2. P. 461–553.
  5. Liberatore G. T., Jackson-Lewis V., Vukosavic S. et al. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease // *Nature Med*. 1999. Vol. 5, № 12. P. 1403–1409.
  6. Madinier A., Bertrand N., Mossiat C. et al. Microglial involvement in neuroplastic changes following focal brain ischemia in rats // *PLoS One*. 2010. Vol. 4, № 12. P. 1–12.
  7. Murer M. G., Yan Q., Raisman-Vozari R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease // *Progr. Neurobiol*. 2001. Vol. 3. P. 71–124.
  8. Murphy S. Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS // *Glia*. 2000. Vol. 29, № 1. P. 1–13.
  9. Porritt M. J., Batchelor P., Howells D. Inhibiting BDNF expression by antisense oligonucleotide infusion causes loss of nigral dopaminergic neurons // *Exp. Neurol*. 2005. Vol. 192. P. 226–234.
  10. Przedborski S., Ischiropoulos H. Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease // *Antioxid. Redox. Signal*. 2005. Vol. 7. P. 685–693.
  11. Sastre M., Richardson J. C., Gentleman S. M., Brooks D. J. Inflammatory risk factors and pathologies associated with Alzheimer's disease // *Curr. Alzheimer Res*. 2011. Vol. 8, № 2. P. 132–141.
  12. Takano K., Yamasaki H., Kawabe K., Moriyama M., Nakamura Y. Imipramine induces brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in cultured astrocytes // *J. Pharmacol. Sci*. 2012. Vol. 120, № 3. P. 176–186.
  13. Takemoto T., Ishihara Y., Ishida A., Yamazaki T. Neuroprotection elicited by nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor released from astrocytes in response to methylmercury // *Environ. Toxicol. Pharmacol*. 2015. Vol. 40, № 1. P. 199–205.
  14. Tansey M. G., Goldberg M. S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention // *Neurobiol Dis*. 2010. Vol. 37, № 3. P. 510–518.
  15. Wu D. C., Teismann P., Tieu K. et al. NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease // *PNAS*. 2003. Vol. 100, № 10. P. 6145–6150.

Поступила в редакцию 07.10.2017

Получена после доработки 03.11.2017

# **AGE-DEPENDENT DIFFERENCES OF LPS-INDUCED BDNF AND iNOS IN RAT SUBSTANTIA NIGRA**

*Ye. S. Zakoliukina<sup>1</sup>, V. M. Chuchkov<sup>1</sup>, T. N. Sergeyeva<sup>1</sup>,  
O. A. Vezheyeva<sup>1</sup>, V. G. Sergeyev<sup>1, 2</sup>*

**Objective** — to study the intensity of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and inducible NO-synthase (iNOS) expression by substantia nigra glial cells in rats of different ages in norm and in neuroinflammation.

**Materials and methods.** Experiments were performed on 36 male Wistar rats: 18 young animals with the body weight of 250–300 g and 18 old animals weighing 380–420 g. Using immunohistochemical method, these markers were detected in frozen sections in substantia nigra astro- and microgliaocytes 8 weeks after stereotaxic unilateral injection of lipopolysaccharide (LPS) into this region.

**Results:** Number of GFAP- and CD11β-positive cells (astro- and microgliaocytes respectively) was significantly increased in the substantia nigra of old animals. 8 weeks after endotoxin administration, age-related differences in LPS-induced production of BDNF and iNOS were found. The injection of LPS intensified the production of BDNF in astrocytes in young but not old animals, while at the same time microglial cells of older animals expressed iNOS much more intensively.

**Conclusions:** The balance of trophic and damaging factors synthesized by glial cells of the substance nigra in response to endotoxin stimulation depends on age. The glial response to endotoxin stimulation in young animals has a protective character, whereas in older animals it increases the risk of oxidative damage of neurons.

**Key words:** *BDNF, iNOS, microglia, astroglia, neuroinflammation*

<sup>1</sup> Department of Physiology, Cell Biology and Biotechnology, Udmurt State University, 1, Universitetskaya Str., Izhevsk 426034, <sup>2</sup> Educational and Research Laboratory, Izhevsk State Medical Academy, 281, Kommunarov Str., Izhevsk 426034