

Е.Ю. Парнышкова¹, В.П. Лавровская^{1,2}, Е.Н. Безгина¹, Л.Л. Павлик^{1,2}, Э.И. Лежнев^{1,2} и Д.А. Мошков^{1,2}

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ВЛИЯНИЯ ДОФАМИНА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НЕР-2

¹ Лаборатория ультраструктуры нейрона (зав. — проф. Д.А. Мошков), Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино; ² магистерская образовательная программа «медико-биологические науки» (зав. — проф. Э.И. Лежнев), Пущинский государственный университет; e-mail: scroll_live@rambler.ru, d_moshkov@mail.ru

Целью работы явилось изучение морфофункциональной организации классического объекта цитологических исследований, культивируемых раковых клеток НЕР-2, используя дофамин в качестве проникающего препарата, полимеризующего цитозольный глобулярный актин. Установлено, что дофамин, присутствующий в среде инкубации, пропорционально концентрации от $1,0 \times 10^{-4}$ М до $1,0 \times 10^{-3}$ М и длительности воздействия от 2 до 3 сут снижает жизнеспособность и нарушает строение культивируемых клеток НЕР-2. Они, по электронно-микроскопическим данным, сливаются и лизируются из-за появления сети актиновых нитей в локусах, где в контроле доминирует глобулярный актин. Рецепторы дофамина не влияют на его цитотоксический эффект. Об этом свидетельствуют флюоресцентно-микроскопические данные о его проникновении в подопытные клетки в присутствии галоперидола и гибель клеток НЕР-2 под действием пиримидинтиона, схожего с дофамином по свойствам, но не имеющего собственных рецепторов. Предполагается, что цитоплазматической мишенью дофамина является глобулярный актин, и что вызванная его полимеризация наносит вред раковым клеткам.

Ключевые слова: опухолевые клетки НЕР-2, дофамин, выживаемость, гистология, ультраструктура, флюоресцентная микроскопия, реакция Фалька

Недавно в серии исследований *in vivo* и *in vitro* нами был выявлен новый, цитоскелетный механизм действия дофамина на живые клетки [4]. Было установлено, что этот биогенный амин и нейротрансмиттер проникает в цитозоль и взаимодействует с глобулярным актином, в результате чего внутри клеток формируются актиновые нити со встроенными в них молекулами дофамина, люминесцирующими после цитохимической обработки клеток по методу Фалька [3, 8, 9]. В связи с этим возникла предпосылка использовать дофамин как проникающее вещество, полимеризующее актин, для исследования роли этого цитоскелетного белка в морфофункциональной организации живых клеток различной природы и для визуализации актина внутри клеток. Наиболее актуальными в этом плане представляются опухолевые клетки, малигнизация и метастазирование которых обусловлены патологически ослабленной возможностью формировать межклеточные контакты и цитоскелет из-за того, что их цитозоль, в отличие от такового у нормальных клеток, в основном состоит из глобулярного актина, субстрата для взаимодействия с дофамином. Действительно, как недавно установлено, дофамин многократно сильнее повреждает и вызывает гибель вирус-трансформированных малигнизированных клеток культуры 3ТЗВ-SV40, чем минимально трансформированных клеток 3ТЗ-А31 [7]. Целью данной работы явилось изучение морфо-

функциональной организации классического объекта цитологических исследований, культивируемых раковых клеток НЕР-2, используя дофамин в качестве проникающего препарата, полимеризующего цитозольный глобулярный актин, ранее для этого не используемого.

Материал и методы. Исследовали клетки рака гор-тани НЕР-2, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в чашках Петри емкостью 5 мл при 37 °С и 5% CO₂ в среде, содержащей RPMI-1640 и DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) в соотношении 1:1 с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота и гентамицина (80 мкг/мл). Для предотвращения побочного эффекта окисления дофамина (Orion, Phagma, Финляндия) применяли метабисульфит натрия (200 мкМ) [8], $1,6 \times 10^{-4}$ М, $2,0 \times 10^{-4}$ М, $5,0 \times 10^{-4}$ М, $1,0 \times 10^{-3}$ М и $5,0 \times 10^{-3}$ М. Дофамин вносили в клеточную суспензию одновременно с посевом (до распластывания клеток на дне чашки). Определяли степень заполненности поля, т.е. степень адгезии клеток при формировании монослоя (конфлюентность): оценивали соотношение пустого и занятого клетками поля (%) при формировании монослоя с помощью морфометрической программы «Морфология» (автор программы — А.А. Деев). Выживаемость (жизнеспособность) клеток оценивали через 2–3 сут после посева путем подсчета в камере Горяева живых и погибших клеток при окраске трипановым синим и используя формулу: $V = K_2 \times 100 / K_1$, где K_1 — количество посеянных клеток, K_2 — количество клеток в контроле и в присутствии дофамина [3]. Для контроля влияния рецепторов дофамина на его эффект применяли: а) галоперидол (ГП), их блокатор, концентрацией 10 мкмоль [8]; б) синтетический препарат пиримидинтион (синтезирован проф. А.С. Фисюком,

Омский государственный университет, любезно предоставлен Ю.В. Шаталиным, ИТЭБ РАН), который имеет низкое сродство к рецепторам дофамина, не имеет собственных рецепторов на клетках, но схож с дофамином по воздействию на ультраструктуру и функции живых клеток и на выделенный актин [4, 5]. Для электронно-микроскопического исследования клетки фиксировали по методике, применяемой в нашей лаборатории и описанной ранее [8], в тех же сосудах, в которых проводили культивирование, обезживали в растворах этанола возрастающей концентрации и ацетоне и заливали в эпон-812. Клетки изучали непосредственно в залитом монослое под световым микроскопом NU-2E (Carl Zeiss, Германия), снабженном цифровым фотоаппаратом Nikon CoolPix 995 (Nikon, Япония). Для электронной микроскопии (Tesla BS-500, Чехословакия) выбранные после гистологического осмотра группы клеток вырезали в виде блока и делали ультратонкие срезы с помощью ультратома EM UC6 (Leica, Германия).

Для цитохимической визуализации дофамина в клетках культуры HEp-2 использовали ранее описанную методику прикрепления их к покровному стеклу, положенному на дно чашек Петри [9]. В данной работе использовали концентрацию дофамина $1,0 \times 10^{-3}$ М и инкубацию в течение 5 ч. Клетки, прикрепившиеся к покровному стеклу, изучали прямо на нем, промыв их трехкратным погружением в буфер. В качестве контроля влияния рецепторов дофамина на его проникновение внутрь клеток изучали отдельно клетки, предварительно подвергнутые действию галоперидола, а также клетки после совместного действия галоперидола и дофамина. Цитохимическую реакцию на катехоламины (дофамин) осуществляли по методу Фалька [9]. Полученные препараты клеток высушивали 2 сут над концентрированной серной кислотой и нагревали до 80°C над параформальдеги-

дом. Изохинолины, образовавшиеся в процессе конденсации катехоламинов и паров формальдегида, визуализировали по флюоресценции при 490–500 нм ($\lambda_{\text{ex}}=375$ нм) с помощью микроскопа AXIO Imager Z1 (Carl Zeiss, Германия), за пользование которым и помощь при съемке авторы благодарят В.А. Яшина (Институт биофизики клетки РАН).

Результаты исследования. При оценке жизнеспособности клеток по состоянию культуры HEp-2 в разные сроки инкубации в контрольных условиях, а также в присутствии разных концентраций дофамина в среде выявлено, что раковые клетки HEp-2, так же как и обычные фибробласты, подвержены цитотоксическому действию дофамина, которое усиливалось с ростом концентрации дофамина и длительностью культивирования (рис. 1). Наибольший эффект дофамина, а также пиримидинтиона, его синтетического аналога по морфологическому и функциональному действию на клетки, наблюдался через 72 ч инкубации, при этом введение в среду метабисульфита не сказывалось на жизнеспособности клеток HEp-2. Жизнеспособность клеток при действии дофамина в концентрации $2,0 \times 10^{-4}$ М по сравнению с контролем практически не изменялась, в концентрации $5,0 \times 10^{-4}$ М — снижалась до 12%, а в концентрации $1,0 \times 10^{-3}$ М — до 5,4%, т.е. в 8,3 и в 18,5 раза соответственно. Для сравнения действие пиримидинтиона в концентрации $1,0 \times 10^{-3}$ М снижает жизнеспособность клеток до 31%, или

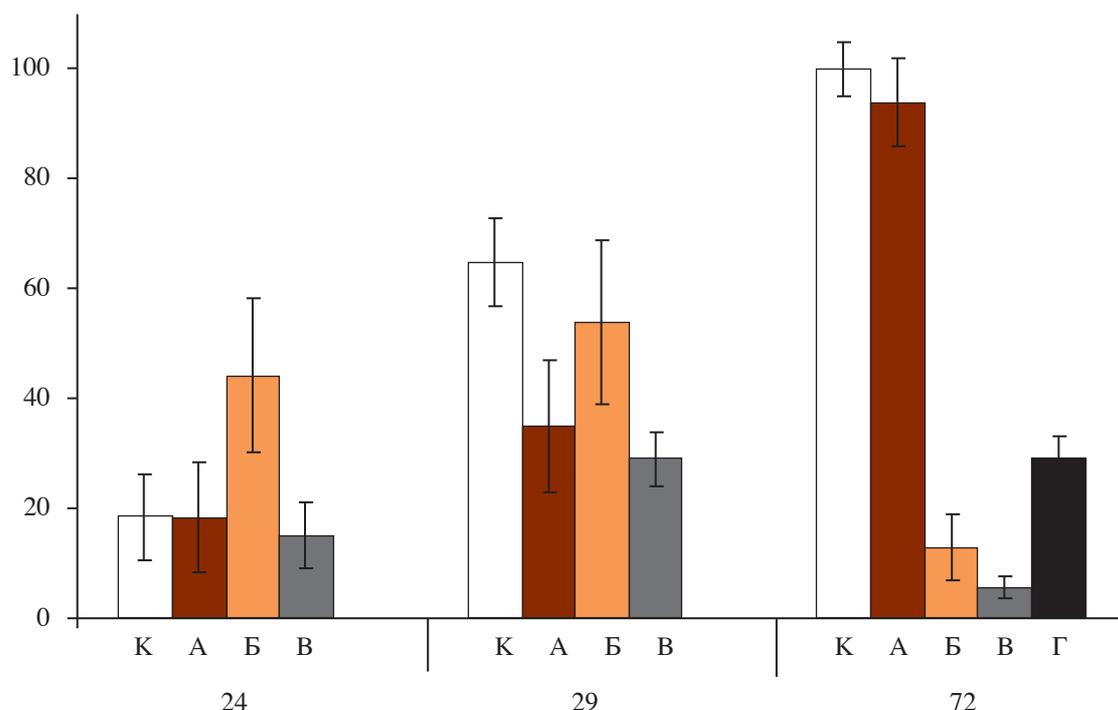


Рис. 1. Зависимость формирования монослоя культуры раковых клеток HEp-2 от срока инкубации и концентрации в среде дофамина.

По горизонтальной оси: К — контроль; концентрация дофамина: А — $2,0 \times 10^{-4}$ М; Б — $5,0 \times 10^{-4}$ М; В — $1,0 \times 10^{-3}$ М; Г — концентрация пиримидинтиона 10^{-3} М; длительность культивирования (ч); по оси ординат — степень заполненности поля (%); вертикальные отрезки — 95% доверительный интервал.

в 3,2 раза. Вместе с тем, анализ динамики роста культур в контроле и при действии на раковые клетки содержащегося в сыворотке дофамина показывает, что в контроле наблюдалось быстрое монотонное увеличение числа клеток на протяжении 72 ч культивирования. В то же время, увеличение числа подопытных клеток было более медленным и монотонным и не зависым от концентрации дофамина только первые 29 ч, а в следующий затем период наблюдались значительные изменения в росте клеток в зависимости от концентрации дофамина. При концентрации $2,0 \times 10^{-4}$ М культура восстанавливалась и через 72 ч по плотности достигала контрольного значения. При концентрации $5,0 \times 10^{-4}$ М и 1×10^{-3} М ее плотность резко падала практически до нуля, что свидетельствует о массовой гибели клеток.

Морфологическое изучение культур клеток под действием дофамина и пиримидинтиона показало (рис. 2), что после 72-часовой инкубации в контроле формируется плотный монослой, хотя сами клетки остаются округлыми, цитоплазма содержит многочисленные вакуоли, а между клетками заметны узкие просветы, свидетельствующие о неплотном их прилегании друг к другу (см. рис. 2, а). Под влиянием дофамина в концентрации $2,0 \times 10^{-4}$ М клетки формируют такой же монослой, как и в контроле, однако некоторые клетки сливаются друг с другом, становятся двудерными, другие частично лизируются и напоминают клеточные «тени» (см. рис. 2, б). В концентрации $5,0 \times 10^{-4}$ М дофамин оказывает еще большее воздействие на культуру. Целостный монослой не образовывается, значительные просветы между скоплениями клеток свидетельствуют о неполном заполнении ими дна чашки Петри, сильно искажается индивидуальное строение клеток (см. рис. 2, в). Они, как правило, гипертрофированы в результате слияния нескольких клеток, имеют протяженные многочисленные выросты, направ-

ленные в сторону просветов в монослое, их ядра приобретают пикнотический вид. Еще большие повреждения клеток наблюдаются при концентрации дофамина $1,0 \times 10^{-3}$ М. Можно встретить лишь единичные прикрепившиеся клетки, сильно варьирующие по строению, и фрагменты разрушенных клеток (см. рис. 2, г). Аналогичную картину наблюдали при действии на культуру клеток пиримидинтиона в концентрации $1,0 \times 10^{-3}$ М (см. рис. 2, д).

Электронно-микроскопические исследования выявили детали повреждений клеток, наблюдаемых под световым микроскопом. В норме клетки НЕР-2 довольно далеко отстоят друг от друга, отделенные широкими просветами, соединяясь в монослой с помощью немногочисленных и коротких десмосомоподобных контактов (рис. 3, а). Типичны многочисленные просветления цитоплазмы разной величины, заметные и на светооптическом уровне. В целом, опухолевые клетки выглядят жизнеспособными, неповрежденными, имеют обычное для них строение, характеризующееся тонким кортикальным слоем, построенным из актиновых филаментов, и практически полное отсутствие цитоскелетных фибрилл в толще цитоплазмы. Действие дофамина приводит к повреждению ультраструктуры опухолевых клеток. Обращает на себя внимание появление характерных муаровых узоров в цитоплазме и обширных просветов в виде лакун лизисного происхождения, захватывающих цитоплазматический и ядерный матрикс (см. рис. 3, б). Митохондрии выглядят не поврежденными. При большем увеличении видно, что в цитоплазме появляются многочисленные хаотически расположенные микрофиламенты, иногда собирающиеся в пучки, часть из них ассоциируются с лакунами (см. рис. 3, в). Кортикальный слой таких клеток значительно утолщается благодаря появлению дополнительных рыхло расположенных актино-

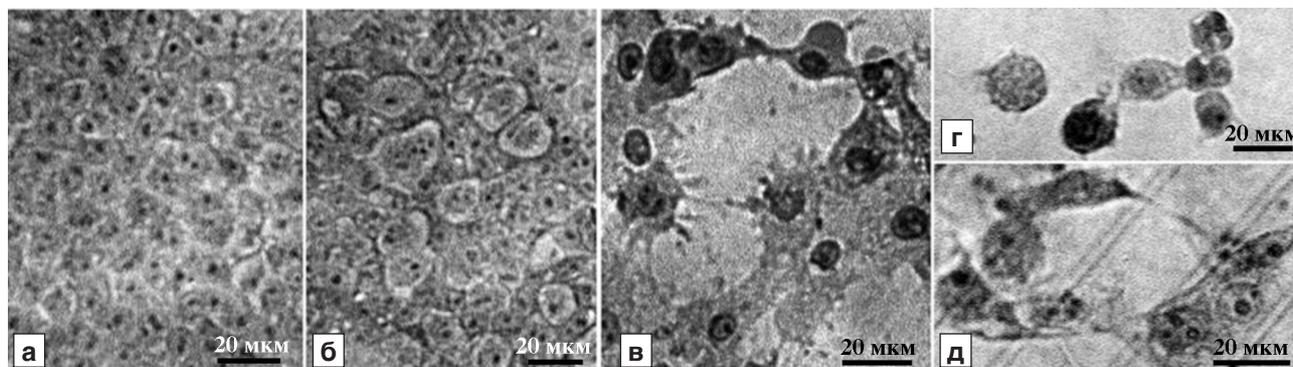


Рис. 2. Клетки рака гортани НЕР-2 после 3-суточной инкубации.

а — контроль; б-г — в присутствии $2,0 \times 10^{-4}$ М (б); $5,0 \times 10^{-4}$ М (в) и $1,0 \times 10^{-3}$ М (г) дофамина; д — в присутствии $1,0 \times 10^{-3}$ М пиримидинтиона.

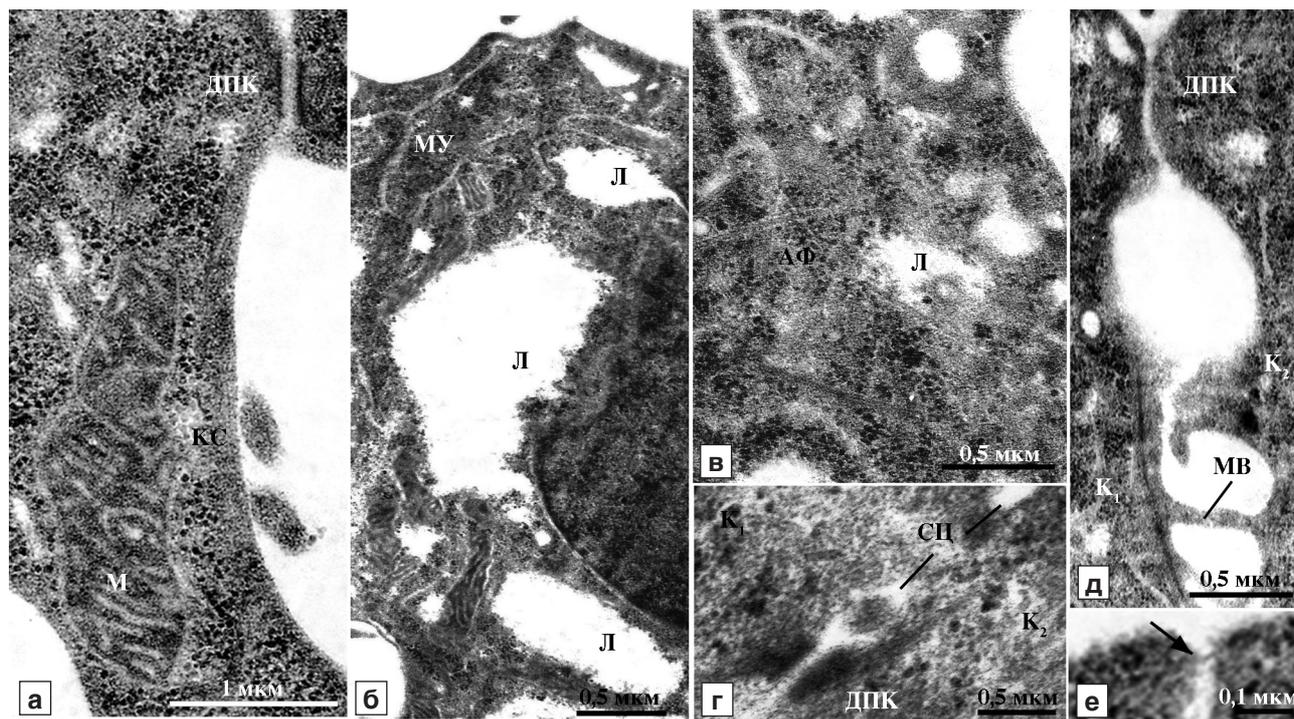


Рис. 3. Ультраструктура раковых клеток НЕр-2 после 3-суточной инкубации с дофамином в концентрации 2×10^{-4} М.

а — контрольная раковая клетка, часть поверхности с десмосомоподобным контактом (ДПК) и кортикальным слоем (КС); М — митохондрия; б-е — раковые клетки, подвергнутые действию дофамина. б — общий вид, видны муаровые узоры (МУ) и лизисные лакуны (Л); в — участок цитозоля в глубине клетки при большем увеличении, видны многочисленные актиновые филаменты (АФ), ассоциированные с лакунами (Л); г-е — повреждения контактов двух соседних клеток (K_1 и K_2) со сливанием части цитоплазмы (СЦ) в области десмосомоподобных контактов (г), со сливанием смежных микроворсинок (МВ) (д), шунтирование двух клеток через плазмолемму актиновым мостиком (стрелка — е).

вых филаментов, следующих вдоль плазмолеммы или вглубь цитоплазмы и иногда перфорирующих плазмолемму. Размер десмосомоподобных контактов не изменяется, однако выявлены многочисленные случаи локального сливания цитоплазмы двух соседних клеток вблизи от таких специализированных контактов (см. рис. 3, г). В качестве других примеров можно указать на полное сливание микроворсинок, принадлежащих двум разным клеткам (см. рис. 3, д), а также на шунтирование смежных микроворсинок актиновым мостиком, пронизывающим плазмолемму и следующим затем вглубь цитоплазмы (см. рис. 3, е).

Флюоресцентная микроскопия клеток НЕр-2, применяемая для визуализации дофамина в цитозоле, выявляемого цитохимической реакцией Фалька, показала, что в норме катехоламинов внутри клеток практически нет, о чем свидетельствует почти полное отсутствие люминесценции (рис. 4, а). Инкубация клеток в среде, содержащей дофамин в комбинации с галоперидолом, приводит к многократному росту интенсивности свечения по всему объему клеток, показывающему содержание дофамина в высокой концентрации в цитоплазме и ядрах (см. рис. 4, б). Высокая интенсивность люминесценции не позволила различить

свечение поверхности клеток на фоне цитоплазмы. Однако в препаратах клеток НЕр-2, подвергнутых действию одного галоперидола, люминесценция выявлена исключительно на периферии клеток, в полном соответствии с представлением о его блокаде рецепторов дофамина, расположенных на плазмолемме, благодаря лигандным взаимодействиям.

Обсуждение полученных данных. Проведенное исследование показало, что дофамин оказывает цитотоксическое действие на раковые клетки. Бросается в глаза взаимосвязь гибели клеток с появлением аномального количества актиновых филаментов и с ростом концентрации дофамина в одних и тех же локусах внутри клеток. Учитывая данные о способности дофамина прямо полимеризовать актин и интегрироваться с актиновыми филаментами [4], можно предположить, что механизм цитотоксичности связан с насильственной индукцией внутри клеток полимерных молекул актина. Все это свидетельствует в пользу того, что цитозольный актин опухолевых клеток представляет собой терапевтическую мишень дофамина. Сам дофамин, во-первых, является проникающим полимеризующим внутриклеточный актин инструментом, который можно

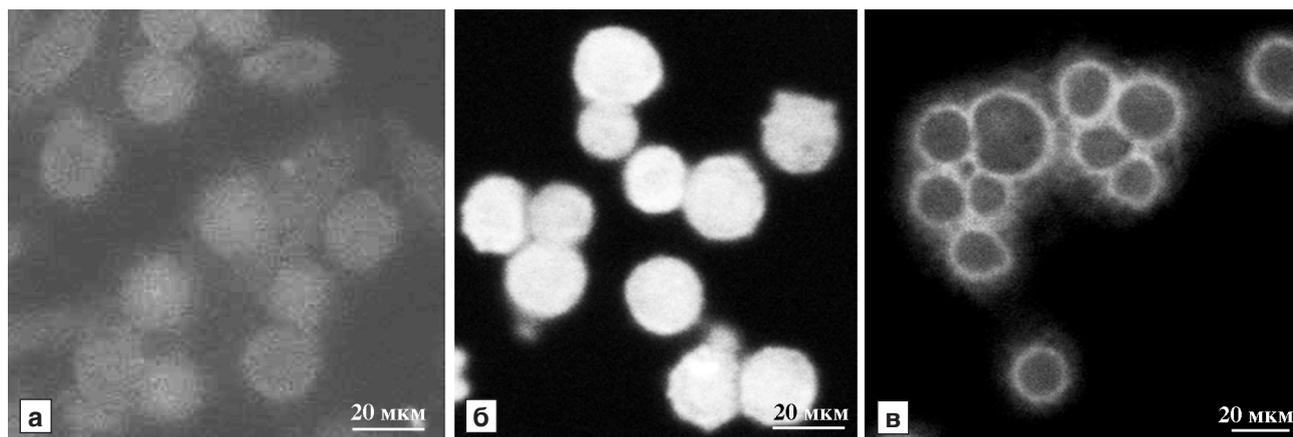


Рис. 4. Клетки культуры HEp-2 в контроле и после воздействия дофамина и галоперидола.

а — контрольные клетки HEp-2; б — клетки HEp-2 + 10 мкмоль галоперидола + дофамин в концентрации 10^{-3} М; в — клетки HEp-2 + 10 мкмоль галоперидола. Цитохимическая реакция Фалька.

использовать для исследования роли актина в клетках, а во-вторых, его можно рассматривать как прототип для конструирования на его основе новых терапевтических противоопухолевых препаратов. На последнее указывают также данные о гораздо более сильном воздействии дофамина, оказываемом на раковые, чем на нормальные клетки, впервые обнаруженном ранее [7], и данные настоящей работы о влиянии пиримидинтиона. Использование дофамина (или созданных на его основе препаратов) в последнем качестве обещает быть не только эффективным, но и избирательным. Это связано с преимущественной чувствительностью к нему только первичных малигнизированных клеток и метастазов, богатых глобулярным актином. В целом, дофамин можно рассматривать как проникающий препарат с полимеризующим актин механизмом действия, близкий к уже известным веществам с такими же свойствами, бициклопептиду фаллоидину и циклодепептиду джасплакинолиду [1, 12]. Вместе с тем, он несколько отличается от них. Фаллоидин сам по себе и меченный флуоресцентным красителем в клетку не проникает, его инъецируют [11]. Джасплакинолид, кстати, используемый и как противоопухолевый препарат [15], метиться не способен, из-за чего работать с ним приходится вслепую, проникает он в клетку только после растворения в спирте или диметилсульфоксиде и оказывает неоднозначное, часто противоположное действие на внутриклеточный актин, что ограничивает его применение [10, 14]. Дофамин легко проникает в клетку, проявляет одинаковые свойства *in vitro* [6] и *in vivo* и прямо выявляется в клетке, что делает его перспективным для исследований в клеточной биологии. Говоря о причине гибели клеток при полимеризации внутриклеточного актина дофамином, ранее

было предположено, что к ней приводит перфорация нитями актина плазмолеммы и нарушение ее целостности [8]. С другой стороны — сравнение динамики роста культур в контроле и опыте позволяет дать еще одно объяснение гибели раковых клеток. Действительно, монотонное быстро нарастающее число клеток на протяжении 72 ч культивирования наблюдается только в контроле. В подопытных культурах монотонное увеличение числа клеток резко замедляется, не зависит от концентрации дофамина и наблюдается только первые 29 ч. Зато в следующий период рост клеток зависит от концентрации дофамина, причем заканчивает практически полной их гибелью при концентрации выше $5,0 \times 10^{-4}$ М. Известно, что клеточный цикл раковых клеток в культуре длится около 10–48 ч [2], т.е. в среднем около 30 ч. В связи с этим можно предположить, что замедление роста клеток под действием дофамина разной концентрации в течение первых 29 ч связано с частичным повреждением плазмолеммы актиновыми филаментами. Они формируются из глобулярного актина, находящегося сразу под поверхностью в кортикальном слое, где его мало, поэтому для его полимеризации достаточно концентрации дофамина 10^{-5} М и ниже [9]. Массовая зависимость от дозы гибели раковых клеток в последующий период приходится на фазу их массового деления и, по-видимому, связана с нарушением процесса деления, вызванным «несвоевременной, насильственной» полимеризацией актина дофамином [13]. Для подтверждения правильности такого предположения нужны дополнительные эксперименты, проведение которых не входило в задачи настоящей работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований № 09–04–00451 и Федеральной целевой программы «Научные и научно-

педагогические кадры инновационной России», государственный контракт № 02.740.11.0301.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виланд Т. и Фаульштих Х. Фаллоидин. В кн.: Итоги и перспективы развития биоорганической химии и молекулярной биологии. М., Наука, 1978, с. 98–110.
2. Давыдов М.Г. Онкология. М., Медицина, 2010.
3. Мошков Д.А., Абрамова М.Б., Шубина В.С. и др. Влияние дофамина на жизнеспособность клеток ВНК-21. Бюл. экпер. биол., 2010, т. 149, № 3, с. 335–339.
4. Мошков Д.А., Павлик Л.Л., Шубина В.С. и др. Цитоскелетная регуляция клеточной функции дофамином. Биофизика, 2010, т. 55, № 5, с. 850–856.
5. Павлик Л.Л., Безгина Е.Н., Шубина В.С. и др. Изменения ультраструктуры и функции маунтеровских нейронов золотых рыбок под влиянием 3,4-дигидро-2(1Н)-пиримидинтиона. Морфология, 2007, т. 131, вып. 1, с. 31–36.
6. Павлик Л.Л., Григорьев П.А., Шубина В.С. и др. Исследование взаимодействия дофамина с искусственными фосфолипидными мембранами. Биофизика, 2008, т. 53, № 1, с. 66–72.
7. Парнышкова Е.Ю. и Лавровская В.П. Цитохимическая визуализация глобулярного актина при малигнизации клеток. В кн.: Рецепция и внутриклеточная сигнализация. Пушино, изд. ОНТИ ПНЦ РАН, 2011, т. 1, с. 403–408.
8. Шубина В.С., Абрамова М.Б., Лавровская В.П. и др. Влияние дофамина на ультраструктуру клеток ВНК-2. Цитология, 2009, т. 51, № 12, с. 996–1004.
9. Шубина В.С., Лавровская В.П., Безгина Е.Н. и др. Цитохимическая и ультраструктурная характеристика клеток ВНК-21, подвергнутых воздействию дофамина. Морфология, 2010, т. 137, вып. 1, с. 5–9.
10. Bubb M. R., Spector I., Beyer V.B. and Fosen K.M. Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. J. Biol. Chem., 2000, v. 275, № 7, p. 5163–5170.
11. Cooper J.A. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. J. Cell Biol., 1987, v. 105, № 4, p. 1473–1478.
12. Holzinger A. Jasplakinolide. An actin-specific reagent that promotes actin polymerization. In: Cytoskeleton: Methods and Protocols, New York, SpringerLink, 2001, v. 161, pt. 3, p. 109–120.
13. Mizuno Ya., Makioka A., Kawazu Sh-i. et al. Effect of jasplakinolide on the growth, invasion, and actin cytoskeleton of plasmodium falciparum. Parasitol. Res., 2002, v. 88, № 9, p. 844–848.
14. Ou G.S., Chen Z.L. and Yuan M. Jasplakinolide reversibly disrupts actin filaments in suspension-cultured tobacco BY-2 cells. Protoplasma, 2002, v. 219, № 3–4, p. 168–175.
15. Takeuchi H., Ara G., Sausville E. and Teicher B. Jasplakinolide: interaction with radiation and hyperthermia in human prostate carcinoma and Lewis lung carcinoma. Cancer Chemother. Pharmacol., 1998, v. 42, № 6, p. 491–496.

Поступила в редакцию 10.04.2011

MORPHOLOGICAL BASES OF DOPAMINE EFFECT ON HEP-2 TUMOR CELLS VIABILITY

Ye.Yu. Parnyshkova, V.P. Lavrovskaya, Ye.N. Bezgina, L.L. Pavlik, Ye.I. Lezhnev and D.A. Moshkov

The purpose of the present investigation was to study the morpho-functional organization of a classical object of cytological research — cultured HEP-2 tumor cells, using dopamine as a penetrating agent, inducing the polymerization of cytosolic actin. It was demonstrated that dopamine introduced into the incubation medium reduced viability and caused morphological disturbances of cultured HEP-2 cells; these effects were proportional to dopamine concentrations (1.0×10^{-4} M to 1.0×10^{-3} M) and exposure duration (2 to 3 days). These cells, according to ultrastructural data, underwent fusion and lysis because of the appearance of actin filaments network in the loci of globular actin prevalence in control cells. Dopamine receptors had no effect on cytotoxic effect of dopamine. This was indicated by fluorescent microscopical evidence of dopamine penetration into experimental cells in the presence of haloperidol, as well as destruction of HEP-2 cells under the action of pyrimidinethione, similar to dopamine by characteristics, but lacking its own receptors. It is suggested that cytoplasmic target for dopamine is globular actin and that induced polymerization of this cytoskeletal protein caused injury to tumour cells.

Key words: HEP-2 tumor cells, ultrastructure, viability, dopamine, fluorescent microscopy

Laboratory of Neuron Ultrastructure, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino; Masters Educational Program in Medical-Biological Sciences, Pushchino State University