

ГЕНДЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СОДЕРЖАНИЯ ЛАМИНОВ В ФИБРОБЛАСТАХ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ХРОНОЛОГИЧЕСКОМ СТАРЕНИИ

Наталья Николаевна ГОЛУБЦОВА, Алексей Владимирович БОГДАНОВ,
Андрей Германович ГУНИН

*Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова
428015, г. Чебоксары, Московский просп., 45*

Цель исследования – изучить гендерные особенности содержания иммунопозитивных по ламинам А, В1 и В2 фибробластов в образцах кожи человека при хронологическом старении. **Материал и методы.** Изучен 331 образец кожи плодов обоого пола от 20 до 40 недель беременности и лиц мужского и женского пола от рождения до 85 лет. Иммуногистохимическим методом исследовано содержание положительно окрашенных дермальных фибробластов и экспрессия ламин А, В1 и В2 в их ядрах. **Результаты и их обсуждение.** Установлено, что постепенное (начиная от пренатального периода и до глубокой старости) снижение содержания у мужчин и женщин фибробластов, позитивных по ламину А, и его экспрессии зависит от возраста, но не имеет различий, связанных с полом. Содержание позитивных по ламину В1 фибробластов, также как экспрессия ламина В1, достоверно уменьшается сразу после рождения и продолжает оставаться сниженным до 40 лет, а затем повышается. Указанные изменения не имеют достоверных отличий по гендерному признаку. Изменение количества положительно окрашенных на ламин В2 фибробластов и экспрессии ламина В2 не имеет статистически достоверной связи с возрастом и полом. Таким образом, гендерных различий в динамических возрастных изменениях содержания и экспрессии белков-ламин в фибробластах кожи при хронологическом старении не установлено.

Ключевые слова: ламин А, ламин В1, ламин В2, фибробласты, кожа, гендерные особенности, хронологическое старение.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 18-44-210001.

Автор для переписки: Голубцова Н.Н., e-mail: golubnata@list.ru

Для цитирования: Голубцова Н.Н., Богданов А.В., Гунин А.Г. Гендерные особенности содержания ламин в фибробластах кожи человека при хронологическом старении. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2019; 39 (4): 71–77. doi: 10.15372/SSMJ20190409.

GENDER FEATURES OF LAMINA CONTENT IN HUMAN SKIN FIBROBLASTS IN A PROCESS OF CHRONOLOGICAL AGING

Natalya Nikolaevna GOLUBTSOVA, Aleksey Vladimirovich BOGDANOV,
Andrey Germanovich GUNIN

*Chuvash State University n.a. I.N. Ul'yanov
428015, Cheboksary, Moskovsky av., 45*

The purpose of the study was to investigate gender peculiarities of the content of fibroblasts immunopositive to lamins А, В1 and В2 in skin samples in a process of chronological aging. **Material and methods.** 331 skin samples at the period from 20 to 40 weeks of gestation and people from birth to 85 years were examined. The content of positively stained dermal fibroblasts and the expression level of lamins А, В1 and В2 in their nucleus was explored by immunohistochemistry. **Results and discussion.** The gradual decrease of fibroblasts with positive staining for lamin А and the expression level of lamin А after antenatal period and up to old age depends on the age, but does not have differences, which are related to gender. The lamin В1 positively fibroblasts content is declining reliably from birth to 40 years and then it is increasing as well as the expression level of lamina В1. The indicated changes don't have reliable variances in gender. The change in the number of lamina В2-positively colored fibroblasts and the expression level of lamina В2 has no statistically valid correlation with gender and age. Thus, there are no gender differences in dynamical age related changes of the content and the expression level of protein-lamina in skin fibroblasts in a process of chronological aging.

Key words: lamin А, lamin В1, lamin В2, fibroblasts, skin, gender features, chronological aging.

Conflict of interests. Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

Acknowledgments. This work was supported by the Russian Science Foundation, grant № 18-44-210001.

Correspondence author: Golubtsova N.N., e-mail: golubnata@list.ru

Citation: Golubtsova N.N., Bogdanov A.V., Gunin A.G. Gender features of lamina content in human skin fibroblasts in a process of chronological aging. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (4): 71–77. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190409.

В эукариотических клетках ядерный геном ограничен и защищен ядерной оболочкой, которая представляет собой двухмембранную систему, разделенную перинуклеарным пространством и пронизанную ядерными пораками. К внутренней ядерной мембране прилежит сеть из промежуточных филаментов (ядерная ламина) [5], в состав которой входят белки трех типов – ламины А, В и С. Исследования последних лет показали, что ламины типа А и В играют важную роль в регуляции репликации ДНК, экспрессии генов и трехмерной организации генома. Ламины В1 и В2 входят в состав периферической ядерной пластинки, где они взаимодействуют с так называемыми ламина-ассоциированными доменами хроматина (LADs) [15]. Ламины А и С (или ламин А/С) локализуются как на периферии ядра, так и внутри него, и также способны взаимодействовать с хроматином [3].

К настоящему времени установлены взаимосвязи между ламинами и процессами, приводящими к возрастным изменениям организма, в том числе обсуждается их возможное участие в механизмах регуляции пролиферативного потенциала фибробластов, который снижается с возрастом [11]. Значительная разница между эмбриональной и взрослой кожей существует и в отношении содержания компонентов внеклеточного матрикса [1]. Например, экспрессия инволюкрина, дермального Ki-67, фибронектина и хондроитинсульфата выше в коже плода, чем у взрослых. В пренатальный период в дерме отсутствует эластин [6]. С возрастом количество белков внеклеточного матрикса уменьшается под действием металлопротеиназ [7]. Синтетическая функция фибробластов в процессе старения меняется в зависимости от пола. Так, уменьшение продукции гиалуроновой кислоты и гепаринсульфата характерно и для мужчин, и для женщин, а снижение синтеза хондроитинсульфата – только для женского организма [14]. Вместе с тем взаимосвязь между содержанием белков ядерной ламины в фибробластах дермы и ее морфофункциональной перестройкой в связи с возрастом и половым диморфизмом остается неизученной. Цель данного исследования заключалась в определении количества ламин-позитивных фибробластов и

экспрессии ламин А, В1 и В2 в фибробластах дермы человека при хронологическом старении у мужчин и женщин.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали аутопсийный материал кожи из нижней части передней поверхности шеи плодов человека и людей, умерших от различных причин внутриутробно (начиная с 20 недели беременности) или после рождения (в возрасте до 85 лет). В области забора кусочков кожи для исследования не было повреждений и патологических изменений. Исследование одобрено Этическим комитетом медицинского факультета Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова (протокол № 3/4 от 31.01.14). Кусочки кожи фиксировали в 4%-м параформальдегиде и заливали в парафин, затем изготавливали срезы толщиной 5–7 мкм.

Ламины А, В1 и В2 выявляли иммуногистохимическим методом. Все препараты проводили по этапам иммуногистохимической реакции одномоментно. Для обнаружения ламин А, В1 и В2 в качестве первых антител использовали поликлональные кроличьи антитела соответственно против ламин А («Gene Tex Inc.», США) в разведении 1 : 20, против ламин В1 (титр 1 : 400, NBP1–42594, «Novus Biologicals Inc.», США) в разведении 1 : 400 и против ламин В2 (NBP2–19325, «Novus Biologicals Inc.», США) в разведении 1 : 400. Для разведения использовали 0,05 М трис-буфер с рН 7,4 с добавлением 0,15 М натрия хлорида [9]. В качестве вторых антител применяли визуализирующую систему «EnVision», конъюгированную с пероксидазой (К 4002, «Dako Cytomation», Дания). Пероксидазу выявляли с использованием 3,3-диаминобензидина. Продукт реакции окрашивался в коричневый цвет. В качестве контроля специфичности окрашивания применяли такую же процедуру обработки срезов, где вместо первых антител использовали нормальную кроличью сыворотку в конечной концентрации 1 %.

В срезах определяли интенсивность окрашивания фибробластов дермы на ламины А, В1 и В2. Для этого препараты фотографировали при уве-

личении 400 с помощью микроскопа «Olympus CX-21» и цифровой камеры «Olympus Camedia 4040z» («Olympus Corporation», Япония). В каждом случае было сфотографировано как минимум 3–5 случайно выбранных полей зрения. Далее фотографии анализировали в программе «Sigma Scan Pro demo 5.0» («Systat Software Inc.», США). Интенсивность окраски на ламины определяли с использованием круглого программного зонда диаметром 19 пикселей по формуле $D = \lg(F_0/F)$, где F и F_0 – оптическая плотность положительно окрашенных структур и фона препарата соответственно. Для определения числа фибробластов с положительной окраской препарата кожи фотографировали при увеличении 400 (не менее трех случайно выбранных полей зрения), с помощью программы «Sigma Scan pro demo 5.0» определяли площадь анализируемого участка препарата, подсчитывали в нем окрашенные на ламины А, В1 и В2 ядра фибробластов и общее число фибробластов. В результате вычисляли долю фибробластов с положительной окраской на ламины А, В1 и В2 и общее число фибробластов на 1 мм² ткани.

Результаты группировали по возрастному принципу: группа 1 – 20–40 недель беременности, группа 2 – 0–20 лет, группа 3 – 21–40 лет, группа 4 – 41–60 лет, группа 5 – 61–85 лет. Для исследования ламина А, В1 и В2 использовали соответственно 112 фрагментов кожи (от 64 мужчин и 48 женщин), 106 (от 62 мужчин и 44 женщин) и 113 (от 57 мужчин и 56 женщин). По каждой группе данных рассчитывали средние арифметические величины (M) и их стандартные ошибки (m). Достоверность влияния возраста и пола на исследуемые параметры кожи оценивали с помощью дисперсионного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Фибробласты с положительной окраской на ламины А, В1 и В2 выявлены в препаратах кожи плодов и людей мужского и женского пола всех изученных возрастных групп (рис. 1, а; 2, а; 3, а). Количество иммунопозитивных клеток и интенсивность окрашивания фибробластов на ламины А, В1 и В2 изменялись в зависимости от возраста (рис. 1, б, в; 2, б, в; 3, б, в). Так, в образцах кожи плодов мужского пола на сроке 20–40 недель беременности содержание иммунопозитивных по ламину А фибробластов составляло $86,3 \pm 3,5\%$, что на 8 % меньше, чем в образцах кожи женского пола (см. рис. 1, б). В следующей возрастной группе, включающей фрагменты кожи людей от рождения до 20 лет, у мужчин мы наблюдали незначительное повышение содержания фибробластов, позитивных по ламину А, а у женщин их

количество уменьшалось по сравнению с антенатальным периодом на 7 % (см. рис. 1, б). У мужчин 21–40 лет количество содержащих ламин А фибробластов уменьшилось по отношению к предыдущему возрасту на 6 %, а у женщин, напротив, незначительно повысилось. У мужчин 41–60 лет этот параметр не изменился, однако в образцах кожи, полученных у женщин, содержание позитивных по ламину А фибробластов уменьшилось на 10 %. В период от 61 до 85 лет содержание ламин А-позитивных фибробластов у мужчин уменьшилось на 14 %, а у женщин не изменилось (рис. 1, б). Дисперсионный анализ определил достоверное ($p < 0,001$) влияние возраста, но не выявил статистически значимого влияния пола на количество фибробластов, положительно окрашенных на ламин А. Таким образом, несмотря на противоположный характер изменений у мужчин и женщин в каждый из исследованных возрастов, содержание позитивных по ламину А фибробластов в коже лиц обоих полов к 85 годам уменьшается по сравнению с плодовым периодом одинаково: на 16 % у мужчин и на 15 % у женщин.

Содержание иммунопозитивных по ламину В1 фибробластов в группе 1 в образцах кожи лиц мужского и женского пола составляло $57,1 \pm 2,8$ и $67,5 \pm 3,2\%$ соответственно (см. рис. 2, б). В следующий период, с рождения и до 40 лет, мы наблюдали уменьшение содержания позитивных по ламину В1 фибробластов на 33 % как у мужчин, так и женщин. После 41 года оно стало больше в образцах кожи лиц обоих полов: у мужчин увеличилось на 29 % по сравнению с группой 3, а у женщин – на 27 %. В группе 5 содержание положительно окрашенных на ламин В1 фибробластов продолжало возрастать: на 7 % у мужчин и на 3 % у женщин по сравнению с группой 4 (см. рис. 2, б). Дисперсионный анализ установил достоверное ($p < 0,001$) влияние возраста, но не пола на количество позитивных по ламину В1 фибробластов в дерме человека. Итак, содержание ламин В1-положительных фибробластов в дерме человека достоверно уменьшается начиная от рождения и до 40 лет, а затем повышается. Данная закономерность не имеет гендерных различий.

Количество иммунопозитивных к ламину В2 фибробластов в 20–40 недель беременности в образцах кожи лиц мужского и женского пола составляло $78,5 \pm 3,5$ и $82,8 \pm 3,1\%$ соответственно (см. рис. 3, б). Сразу после рождения (0–20 лет) оно снизилось на 5 % у мужчин и на 7 % у женщин. В 3-й и 4-й возрастных группах в образцах кожи как мужчин, так и женщин количество ламин В2-позитивных фибробластов не изменилось по сравнению с группой 2. Только в возрасте 61–85 лет содержание таких клеток у лиц обоего

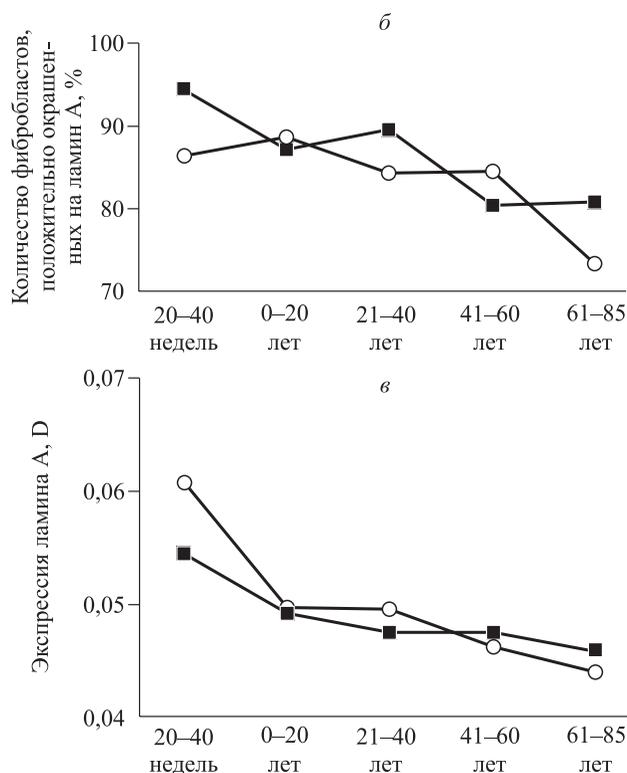


Рис. 1. Результаты иммуногистохимического исследования кожи человека на ламин А: а – иммунопозитивные и иммунонегативные на ламин А фибробласты в дерме, увеличение 1000; б – динамика количества фибробластов с положительной окраской на ламин А в коже мужчин и женщин разного возраста; в – изменение экспрессии ламин А в ядрах фибробластов у мужчин и женщин разного возраста

Fig. 1. The results of immunohistochemical studies of human skin on lamin A: а – immunopositive and immunonegative for lamin A fibroblasts in the dermis, magnification 1000; б – dynamics of the number of lamin A-positive fibroblasts in the skin of men and women of different ages; в – changes in the expression of lamin A in fibroblast nuclei in men and women of different ages

пола уменьшилось на 7 % по отношению к предыдущему возрастному периоду (см. рис. 3, б). Дисперсионный анализ не выявил наличие достоверного влияния ($p < 0,001$) возраста и пола на изменение содержания позитивных по ламину В2 фибробластов.

Измерение интенсивности окрашивания ядер ламин-содержащих фибробластов показало следующее. В дерме плодов на сроке 20–40 недель беременности интенсивность окрашивания фибробластов на ламин А была достаточно высокой (см. рис. 1, а): у плодов мужского и женского пола показатель D составил $0,061 \pm 0,005$ и $0,054 \pm 0,006$ соответственно (см. рис. 1, в). В группе 2, объединяющей образцы кожи людей от рождения до 20 лет, степень окрашивания фибробластов дермы на ламин А уменьшилась на 20 % у мужчин и на 9 % у женщин, в дальнейшем величина показателя не изменялась (см. рис. 1, в).

В 20–40 недель беременности интенсивность окрашивания фибробластов на ламин В1

была равна $0,059 \pm 0,005$ и $0,066 \pm 0,005$ у плодов мужского и женского пола соответственно (см. рис. 2, в), во 2-й и 3-й группах произошло уменьшение величины показателя на 25–28 % у мужчин и на 22–34 % у женщин. Начиная с 41 года до 85 лет интенсивность окрашивания ядер на ламин В1 у мужчин и женщин увеличилась по сравнению с группой 1 на 42 и 37 % соответственно (см. рис. 2, в). Дисперсионный анализ выявил наличие достоверного влияния ($p < 0,001$) возраста на изменение интенсивности окраски фибробластов дермы человека на ламин А и В1, но не установил статистически значимого влияния пола.

Интенсивность окрашивания ядер фибробластов на ламин В2 во всех возрастных группах у женщин была выше, чем у мужчин, в среднем на 5 %, при этом практически не изменяясь с возрастом. По результатам дисперсионного анализа не установлено достоверное влияние ($p < 0,001$) возраста и пола на изменение интенсивности окраски фибробластов дермы человека на ламин В2.

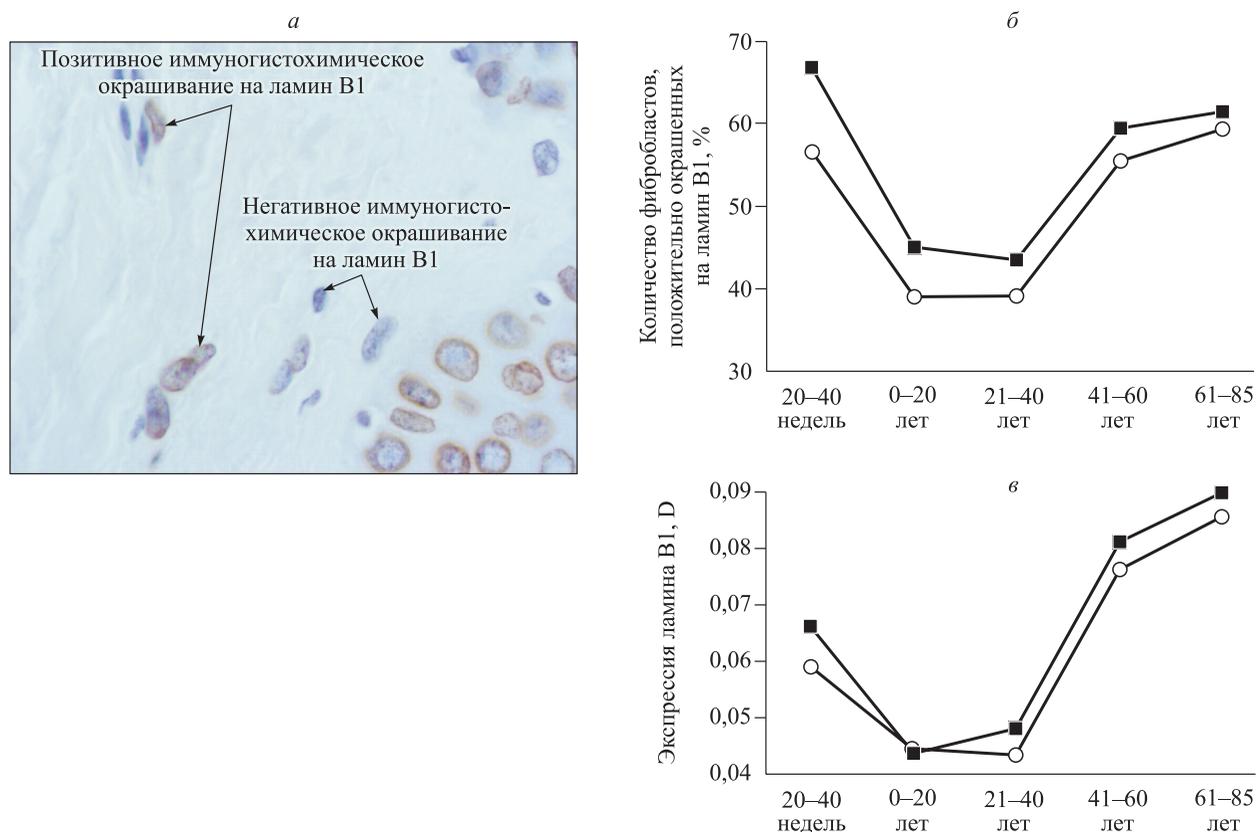


Рис. 2. Результаты иммуногистохимического исследования кожи человека на ламин В1: а – иммунопозитивные и иммунонегативные на ламин В1 фибробласты в дерме, увеличение 1000; б – динамика количества фибробластов с положительной окраской на ламин В1 в коже мужчин и женщин разного возраста; в – изменение экспрессии ламина В1 в ядрах фибробластов у мужчин и женщин разного возраста

Fig. 2. The results of an immunohistochemical study of human skin on lamin B1: а – lamin B1-immunopositive and immunonegative fibroblasts in the dermis, magnification 1000; б – the dynamics of the number of lamin B1-positive fibroblasts in the skin of men and women of different ages; в – changes in the expression of lamin B1 in the nuclei of fibroblasts in men and women of different ages

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты нашего исследования демонстрируют, что вариативность изученных параметров (содержание ламин в ядрах фибробластов и количество ламин-позитивных фибробластов) у мужчин и женщин статистически значимо не различается. Изменение во взаимодействии ламин и генома будет влиять на организацию генома на периферии ядра и внутри ядра независимо от пола [5, 8].

Вместе с тем мы установили, что содержание ламин-позитивных фибробластов и экспрессия ламин А, В1 и В2 зависят от возраста. В антенатальный период преобладают клетки, позитивные по ламину А, доля которых достигает 90 %, их содержание одинаково у плодов мужского и женского пола. Известно, что ламин А синтезируется в виде преламина А, имеющего фарнезилированный участок на С-конце [8], который, вероятно,

не определяется при данном способе детекции. В постнатальный период содержание положительно окрашенных по ламину А фибробластов снижается к 85 годам только на 14 %, что позволяет заключить, что и после рождения ламин А выполняет важную роль в реализации структуры и функции ядра [3]. Известно, что при мутации гена ламин А развивается преждевременное необратимое старение (прогерия) с выраженными изменениями кожи, которая приобретает признаки раннего старения в виде множественных морщин, сухости, уменьшения толщины [10, 13].

Ламины группы В (В1 и В2) кодируются отдельными генами [2, 12] и, по имеющимся данным, экспрессируются в большинстве клеток эмбрионов и взрослых животных [12]. Это дает основание считать, что они необходимы для выживания клеток. Согласно нашим данным, ламин В1 и В2 находятся в большинстве фибробластов плодов мужского и женского пола. После

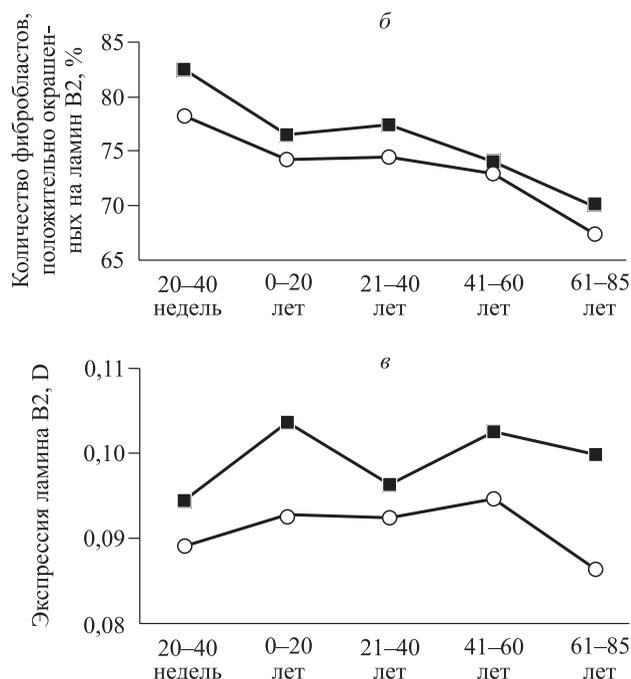
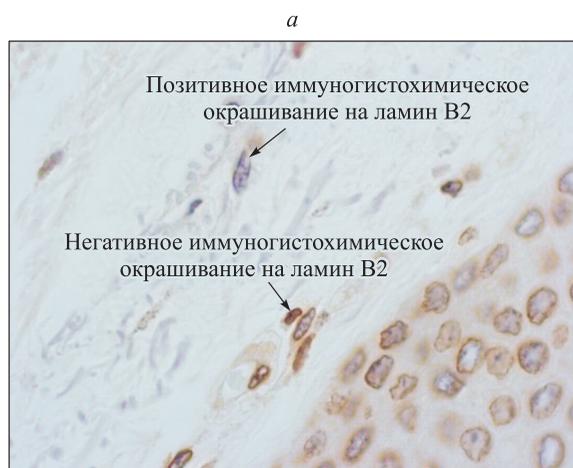


Рис. 3. Результаты иммуногистохимического исследования кожи человека на ламин В2: а – иммунопозитивные и иммунонегативные на ламин В2 фибробласты в дерме, увеличение 1000; б – динамика количества фибробластов с положительной окраской на ламин В2 в коже мужчин и женщин разного возраста; в – изменение экспрессии ламина В2 в ядрах фибробластов у мужчин и женщин разного возраста

Fig. 3. The results of an immunohistochemical study of human skin on lamin B2: а – lamin B2-immunopositive and immunonegative fibroblasts in the dermis, magnification 1000; б – the dynamics of the number of lamin B2-positive fibroblasts in the skin of men and women of different ages; в – changes in the expression of lamin B2 in the nuclei of fibroblasts in men and women of different ages

рождения динамика их содержания существенно различается. Так, количество позитивно окрашенных на ламин В1 фибробластов и экспрессия ламина В1 уменьшаются сразу после рождения и сохраняются на сниженном уровне до 40 лет независимо от пола. По всей видимости, падение содержания ламина В1 в фибробластах в данный возрастной период является одним из факторов, приводящих к характерному для этого возраста уменьшению числа клеток в дерме [9]. В отличие от ламина В1, содержание ламина В2 в фибробластах кожи достоверно не изменяется от 20 недель беременности до 85 лет как у мужчин, так и у женщин. Существует мнение, что к старению клетки приводит сочетанное уменьшение экспрессии ламин В1 и А [13].

Таким образом, получены свидетельства участия ламин в развитии возрастных изменений в организме независимо от пола.

ВЫВОДЫ

1. Содержание позитивных по ламину А фибробластов в образцах кожи человека и экспрессия ламина А в ядрах фибробластов не имеют

гендерных отличий и планомерно уменьшаются начиная с антенатального периода и до 85 лет как у мужчин, так и у женщин.

2. Количество позитивных по ламину В1 фибробластов и экспрессия ламина В1 в ядрах фибробластов не имеют различий, связанных с половой принадлежностью. В образцах кожи лиц обоих полов эти параметры достоверно уменьшаются сразу после рождения, оставаясь низкими вплоть до 40 лет, с 41 до 85 лет их величины возрастают.

3. Содержание позитивно окрашенных по ламину В2 фибробластов и экспрессия ламина В2 в их ядрах не имеет достоверных различий, связанных с возрастом и половым диморфизмом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильева О.В., Голубцова Н.Н., Филиппов Ф.Н., Гунин А.Г. Фактор роста соединительной ткани (СТGF) в дерме человека в онтогенезе. *Онтогенез*. 2016; 47 (2): 75–82.

Vasilieva O.V., Golubtsova N.N., Filippov F.N., Gunin A.G. Connective tissue growth factor (CTGF) in the human dermis through ontogenesis. *Ontogenesis = Ontogenesis*. 2016; 47 (2): 75–82. [In Russian]

2. Barton L.J., Soshnev A.A., Geyer P.K. Networking in the nucleus: a spotlight on LEM-domain proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2015; 34: 1–8.
3. Briand N., Cahyani I., Madsen-Østerbye J., Paulsen J., Rønningen T., Sørensen A.L., Collas P. Lamin A, chromatin and FPLD2: Not just a peripheral ménage-à-trois. *Front. Cell Dev. Biol.* 2018; 6: ID 73.
4. Briand N., Collas P. Laminopathy-causing lamin A mutations reconfigure lamina-associated domains and local spatial chromatin conformation. *Nucleus.* 2018; 9 (1): 216–226.
5. Burke B., Stewart C.L. The nuclear lamins: flexibility in function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013; 14: 13–24.
6. Coolen N.A., Schouten K.C., Middelkoop E. Comparison between human fetal and adult skin. *Arch. Dermatol. Res.* 2010; 302 (1): 47–55.
7. Frantz C., Stewart K.M., Weaver V.M. The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* 2010; 123 (24): 4195–4200.
8. Gesson K., Vidak S., Foisner R. Lamina-associated polypeptide (LAP)2 α and nucleoplasmic lamins in adult stem cell regulation and disease. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2014; 29: 116–124.
9. Golubtsova N.N., Kornilova N.K., Gunin A.G. Age-related changes in serin-arginin protein kinase 1 (SRPK1) content in the human dermis. *Adv. Gerontol.* 2018; 8 (2): 147–152.
10. Gruenbaum Y., Medalia O. Lamins: the structure and protein complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2015; 32: 7–12.
11. Gunin A.G., Petrov V.V., Golubtsova N.N., Vasilieva O.V., Kornilova N.K. Age-related changes in angiogenesis in human dermis. *Exp. Gerontol.* 2014; 55: 143–151.
12. Hutchison C.J. B-type lamins in health and disease. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2014; 29 (100): 158–163.
13. Lund E., Collas P. Nuclear lamins: making contacts with promoters. *Nucleus.* 2013; 4 (6): 424–430.
14. Oh J.H., Kim Y.K., Jung J.Y., Shin J.E., Chung J.H. Changes in glycosaminoglycans and related proteoglycans in intrinsically aged human skin *in vivo*. *Exp. Dermatol.* 2011; 20 (5): 454–456.
15. Van Steensel B., Belmont A.S. Lamina-associated domains: Links with chromosome architecture, heterochromatin, and gene repression. *Cell.* 2017; 169: 780–791.

Сведения об авторах:

Голубцова Н.Н., к.б.н., e-mail: golubnata@list.ru
Богданов А.В., e-mail: alexeivld@mail.ru
Гунин А.Г., д.м.н., e-mail: drgunin@mail.ru

Information about authors:

Golubtsova N.N., candidate of biological sciences, e-mail: golubnata@list.ru
Bogdanov A.V., e-mail: alexeivld@mail.ru
Gunin A.G., doctor of medical sciences, e-mail: drgunin@mail.ru