

© ЗАМАЙ Т. Н., ДМИТРЕНКО Д. В., ШНАЙДЕР Н. А., НАРОДОВА Е. А., НАРОДОВА В. В., УСОЛЬЦЕВА А. А., ПОПОВ И. С.

УДК 577.29

DOI: 10.20333/2500136-2021-2-108-112

Адресная доставка вальпроевой кислоты к клеткам-мишеням при лечении эпилепсии с помощью аптамеров

Т. Н. Замай, Д. В. Дмитренко, Н. А. Шнайдер, Е. А. Народова, В. В. Народова, А. А. Усольцева, И. С. Попов

Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск 660022, Российская Федерация

Цель исследования. Разработать препарат на основе аптамеров, проходящих через гематоэнцефалический барьер, адресно доставляющий вальпроевую кислоту в головной мозг.

Материал и методы. В работе были использованы аптамеры Brain 1 и Co 451, проходящие через гематоэнцефалический барьер, полученные с помощью технологии *in vivo*-SELEX, аффинность которых определяли с помощью проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии. Препарат для адресной доставки вальпроевой кислоты получали с помощью конъюгации конвулекса, биотинилированных аптамеров и белка стрептавидина. Противозепилептическую эффективность препарата оценивали на мышах ICR с литий-пилокарпиновой моделью развития эпилепсии. После инъекции пилокарпина наблюдение за животными проводили с помощью круглосуточной видеорегистрации. Для лечения эпилепсии использовали дозу вальпроевой кислоты, составляющую 130 мкг/г массы животного. При лечении препаратом для адресной доставки доза вальпроевой кислоты была снижена до 5 мкг/г. Оценку эпилептического статуса у мышей проводили по Шкале Racine.

Результаты. У животных при использовании литий-пилокарпиновой модели формировался эпилептический статус на разных стадиях – от 1-ой до 5-ой. Во всех группах животных полного преодоления эпилептического статуса за 120 мин не происходило. В группе мышей, леченных вальпроевой кислотой, в течение 80 мин после начала лечения изменений эпистатуса не происходило. При терапии мышей конъюгатами на основе аптамеров Brain 1 и Co 451 блокада эпилептического статуса у мышей, несмотря на более низкие (в 26 раз) дозы вводимого противозепилептического препарата, происходила быстрее.

Заключение. Разработана научная платформа для разработки препаратов адресной доставки противозепилептических препаратов, обладающих высокой эффективностью и низкой токсичностью.

Ключевые слова: аптамеры, эпилепсия, эпистатус, вальпроевая кислота, адресная доставка, стрептавидин.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Замай ТН, Дмитренко ДВ, Шнайдер НА, Народова ЕА, Народова ВВ, Усольцева АА, Попов ИС. Адресная доставка вальпроевой кислоты к клеткам-мишеням при лечении эпилепсии с помощью аптамеров. *Сибирское медицинское обозрение*. 2021;(2):108-112. DOI: 10.20333/2500136-2021-2-108-112

Addressed delivery of valproic acid to target cells in treatment of epilepsy using aptamers

T. N. Zamay, D. V. Dmitrenko, N. A. Shnaider, E. A. Narodova, V. V. Narodova, A. A. Usolceva, I. S. Popov

Professor V. F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk 660022, Russian Federation

The aim of the research. To develop a drug based on aptamers that cross the blood-brain barrier, targeting the delivery of valproic acid to the brain.

Material and methods. We used the Brain 1 and Co 451 aptamers passing through the blood-brain barrier, obtained using the *in vivo*-SELEX technology, the affinity of which was determined using flow cytometry fluorescence microscopy. The drug for targeted delivery of valproic acid was obtained using the conjugation of Konvulex, biotinylated aptamers, and streptavidin protein. The antiepileptic efficacy of the drug was evaluated in ICR mice with a lithium-pilocarpine model of the development of epilepsy. After the injection of pilocarpine, the animals were monitored using round-the-clock video recording. For the treatment of epilepsy, a valproic acid dose of 130 µg / g of animal weight was used. During treatment with a drug for targeted delivery, the dose of valproic acid was reduced to 5 µg / g. Evaluation of status epilepticus in mice was performed using the Racine Scale.

Results. In animals, using the lithium-pilocarpine model, status epilepticus was formed at different stages - from the 1st to the 5th. In all groups of animals, complete overcoming of status epilepticus did not occur in 120 min. In the group of mice treated with valproic acid, no change in their status occurred within 80 minutes. When mice were treated with conjugates based on the Brain 1 and Co 451 aptamers, the blockade of status epilepticus in mice, despite the lower (26 times) doses of the administered antiepileptic drug, occurred faster.

Conclusion. A scientific platform has been developed for the development of drugs for targeted delivery of antiepileptic drugs with high efficiency and low toxicity.

Key words: Aptamers, epilepsy, status epilepticus, valproic acid, targeted delivery, streptavidin.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest associated with the publication of this article.

Citation: Zamay TN, Dmitrenko DV, Shnaider NA, Narodova EA, Narodova VV, Usolceva AA, Popov IS. Addressed delivery of valproic acid to target cells in treatment of epilepsy using aptamers. *Siberian Medical Review*. 2021; (2):108-112. DOI: 10.20333/2500136-2021-2-108-112

Введение

Эпилепсия – широко распространенное хроническое неврологическое заболевание [1], характеризующееся спонтанными рецидивирующими припадками или эпилептическими приступами фиксированного и длительного характера, которые сопровождаются тоническими судорогами дыхательной мускулатуры, аспирацией слюны и крови из полости рта и аритмией дыхания [2]. Непредсказуемость судорог и связанный с этим физиологический стресс значительно ухудшают качество жизни пациента и окружающих. Международная лига против эпилепсии (ILAE) определила эпилепсию как заболевание головного мозга, приводящее к предрасположенности к возникновению эпилептических припадков, характеризующихся ее психосоциальными последствиями. Диагноз эпилепсии ставят при наличии: (1) как минимум двух неспровоцированных (или рефлекторных) приступов, происходящих в течение 24 часов; (2) одного неспровоцированного (или рефлекторного) припадка и вероятности дальнейших припадков, аналогичных общему риску рецидива (не менее 60%) после двух неспровоцированных припадков, имевших место в течение следующих 10 лет; (3) диагностированного синдрома эпилепсии [3]. Прогрессирование заболевания сопровождается развитием патологических изменений, в частности, обострением спонтанных приступов (например, увеличением их частоты, продолжительности или генерализации), развитием устойчивых к лекарствам приступов, ухудшением невропатологии и началом сопутствующих заболеваний [4]. Препараты для лечения эпилепсии токсичны и вызывают неблагоприятные для организма побочные эффекты.

Наиболее распространенным препаратом для лечения эпилепсии является вальпроевая кислота (ВК) – противоэпилептический препарат широкого спектра действия, включенного в состав препарата конвулекс, используемый для лечения как генерализованных, так и фокальных припадков [5-7], эпилептического статуса у пациентов любого возраста. ВК в настоящее время используется для профилактики мигрени и лечения психических заболеваний, включая биполярное расстройство и расстройства настроения. Нейропротекторные эффекты ВК описаны в моделях острых повреждений ЦНС, включая инсульт и гипоксию, черепно-мозговые травмы и повреждения спинного мозга. Кроме того, ВК предложена в качестве возможного противоракового препарата, способного усиливать эффекты химиотерапевтических средств. Несмотря на широкое распространение вальпроевой кислоты при лечении эпилепсии, стоит отметить ее высокую токсичность, которую она проявляет при длительном использовании [8-10].

В настоящее время большое внимание уделяется доставке молекул лекарственного средства через взаимодействие с конкретными переносчиками или рецепторами, экспрессируемыми на просветной стороне эндотелиальных клеток. Такими переносчиками могут выступать моноклональные антитела, специфичные к рецепторам ГЭБ, или наночастицы. Однако и те, и другие имеют ряд ограничений в использовании – большой размер, иммуногенность антител и потенциальная токсичность наночастиц [11].

В последнее время в качестве средств адресной доставки лекарственных препаратов все большую популярность приобретают функциональные аналоги антител – аптамеры, представляющие собой короткие олигонуклеотидные РНК или ДНК, способные с высокой аффинностью и специфичностью связываться с молекулой-мишенью. Аптамеры обладают преимуществами по сравнению с белковыми антителами, они неиммуногенны, нетоксичны, термостабильны, получение с помощью химического синтеза делает их использование экономически выгоднее [12]. Такие достоинства аптамеров по сравнению с антителами позволяют заменить последние и использовать аптамеры, специфичные к рецепторам гематоэнцефалического барьера, в качестве транспортного вектора для целенаправленной доставки потенциальных лекарственных препаратов в головной мозг [13].

Цель работы – снижение токсичности противоэпилептических препаратов путем их адресной доставки в головной мозг с помощью ДНК-аптамеров.

Материал и методы

Аптамеры Brain 1 и Co 451, проходящие через гематоэнцефалический барьер, были получены с помощью технологии *in vivo*-SELEX [14]. Аффинность аптамеров определяли с помощью проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии.

Препарат для адресной доставки вальпроевой кислоты в головной мозг получали смешиванием аптамеров Brain 1 и Co 451 в количестве 0,8 нмоль с биотинилированным праймером в количестве 0,8 нмоль, комплементарным к 3'-концу. Для принятия правильной конформации аптамеры с праймером нагревали до 95 °C в течение 10 минут и охлаждали на льду 10-15 минут. Биотинилированные аптамеры связывали с флуоресцентным стрептавидином путем их совместной инкубации в течение 30 минут на шейкере при 250 об./мин.

Для контроля за транспортом белка стрептавидина и вальпроевой кислоты перед исследованием проводили обязательную перфузию для замены крови в сосудах головного мозга мыши на фосфатный буфер. Перед началом перфузии мышам вводили 150 мкл 15 % хлоргидрата в качестве анестезии.

Перфузию проводили через 10-15 минут после полного обездвиживания животного, после которого его фиксировали.

Противоэпилептическую эффективность препарата оценивали на мышах ICR с литий-пилокарпиновой моделью развития эпилепсии. После инъекции пилокарпина наблюдение за животными проводили с помощью круглосуточной видеорегистрации. Изменения в поведении с оценкой приступов по шкале Racine проводили в течение 6, 7, 20, 30, 40, 60, 90 и 120 минут.

Животных с эпистатусом разделяли на четыре экспериментальные группы:

1) группа контроля с введением физиологического раствора;

2) группа мышей, которым проводили терапию противоэпилептическим препаратом конвулексом (130 мг/кг);

3) группа мышей, в головной мозг которых адресно с помощью аптамеров Brain 1 и Co 451 в комплексе с белком стрептавидином доставляли противоэпилептический препарат конвулекс (5 мг/кг).

Инъекции препаратов проводили внутрибрюшинно через 40 минут от начала индукции эпилептического статуса.

Результаты и обсуждение

Оценку формирования эпилептического статуса у мышей проводили по Шкале Racine [15]. В процессе эксперимента за животными велось круглосуточное наблюдение с помощью видеокамеры. Животные, у которых был сформирован эпилептический статус, на протяжении нескольких минут оставались бездвиженными. Через 5 минут активный образ животных с эпилептическим статусом восстанавливался.

Результаты противоэпилептической терапии конвулексом и конъюгатом стрептавида с аптамерами, проходящими через ГЭБ, представлены в таблицах 1 и 2.

Результаты формирования литий-пилокарпиновой модели у мышей показали, что эпилептический статус формировался у всех мышей, однако он оказался очень индивидуальным и отличался у мышей от 1-ой до 5-ой стадий. Мыши с 3-ей и 5-ой стадией развития эпилептического статуса погибли.

Контрольные мыши к началу терапии находились на следующих стадиях: 3 мыши – на стадии 1, одна мышь – на стадии 3 и одна мышь – на стадии 5. Мышь, у которой сформировался эпистатус 5-ой стадии погибла через 90 минут после введения пилокарпина. В группе мышей перед терапией конвулексом 3 из 6-ти

Таблица 1

Динамика изменения эпилептического статуса у мышей в процессе его формирования и терапии конвулексом и конъюгатами стрептавида с аптамерами Brain 1 и Co 451

Table 1

Dynamics of changes in status epilepticus in mice during its formation and therapy with konvulex and streptavidin conjugates with Brain 1 and Co 451 aptamers

Группы мышей	Время, мин					Терапия	Время, мин		
	6	7	20	30	40		60	90	120
Контроль (n=5)									
Стадия эпистатуса (мышь № 1)	1	1	2	2	1	Физ. раствор	1	1	1
Стадия эпистатуса (мышь № 2)	1	1	1	1	2	Физ. раствор	1	1	1
Стадия эпистатуса (мышь № 3)	1	1	1	4	5	Физ. раствор	5	смерть	
Стадия эпистатуса (мышь № 4)	1	1	2	1	3	Физ. раствор	3	4	1
Стадия эпистатуса (мышь № 5)	1	1	2	2	1	Физ. раствор	1	4	1
Конвулекс (n=6)									
Стадия эпистатуса (мышь № 1)	1	1	1	2	2	Конвулекс	1	1	1
Стадия эпистатуса (мышь № 2)	1	1	1	1	1	Конвулекс	1	1	1
Стадия эпистатуса (мышь № 3)	1	1	2	2	3	Конвулекс	1	1	1
Стадия эпистатуса (мышь № 4)	1	2	3	3	смерть	Конвулекс			
Стадия эпистатуса (мышь № 5)	1	1	1	1	1	Конвулекс	1	1	1
Стадия эпистатуса (мышь № 6)	1	1	1	1	1	Конвулекс	1	1	1
Комплекс конвулекса со стрептавидином и аптамерами									
Стадия эпистатуса (мышь № 1)	1	1	1	2	4	Конвулекс-стрептавидин-аптамеры	4	4	2
Стадия эпистатуса (мышь № 2)	1	1	1	2	3	Конвулекс-стрептавидин-аптамеры	2	1	1
Стадия эпистатуса (мышь № 3)	1	2	2	1	2	Конвулекс-стрептавидин-аптамеры	3	3	3
Стадия эпистатуса (мышь № 4)	1	2	2	1	2	Конвулекс-стрептавидин-аптамеры	1	1	1
Стадия эпистатуса (мышь № 5)	1	2	2	1	1	Конвулекс-стрептавидин-аптамеры	1	1	1

Таблица 2

Суммарные результаты терапии мышей с эпилептическим статусом (ЭС)

Table 2

Cumulative results of therapy in mice with status epilepticus (ES)

Терапия	Количество мышей, у которых приступы прекратились после начала лечения (n/N)			Выживаемость через 120 мин (n/N)	Выживаемость через 1-2 дня после ЭС (n/N)	Суммарное изменение ЭС через 120 мин	Количество мышей со снижением стадии ЭС при терапии ЭС через 120 мин.
	10 мин	20 мин	120 мин				
Контроль (n=5)	0/5	0/5	0/5	1/5	2/5	-3	2
Конвулекс (n=5)	0/6	0/5	0/5	1/5	2/5	-3	2
Комплекс конвулекса со стептавидином и аптамерами (n=5)	0/5	0/5	0/5	5/5	2/5	-4	3

мышей находились в стадии 1, и по одной мыши – на стадиях 2 и 3. Одна мышь с 3-ей стадией эпилептического статуса погибла. В 3-ей группе мышей адресной терапии конвулексом перед лечением мыши находились на более высоких стадиях развития эпилептического статуса: по одной мыши – на стадиях 3 и 4, 2 мыши – на стадии 2 и лишь одна мышь – на стадии 1.

У животных при формировании литий-пилокарпиновой модели формирования эпилепсии наблюдались непрерывные приступы, колеблющиеся от 1-ой до 5-ой стадий по модифицированной шкале Racine. В контрольной группе мышей без лечения происходило постепенное снижение выраженности эпилептического статуса. Конвулекс снижал эпилептический статус только у одной мыши, у остальных мышей терапия конвулексом не приводила к снижению выраженности эпилептического статуса. В группе мышей с адресной доставкой конвулекса с помощью аптамеров эпилептические приступы так же, как и у мышей других групп, не прекратились через 120 минут от начала лечения, однако у некоторых животных заметно уменьшились.

Поскольку все мыши в момент начала терапии находились на разных стадиях развития эпилептического статуса, то для оценки эффективности препаратов мы использовали суммарное изменение стадий эпилептического статуса у всех мышей после начала терапии в качестве информативного показателя. Суммарное изменение эпилептического статуса у мышей без терапии составило -3, при этом только у двух мышей статус не изменился, у одной мыши снизился на один пункт и у другой – на 2 пункта (табл. 2).

При лечении конвулексом суммарное изменение эпилептического статуса у всех мышей также составило -3. При этом у 3-х мышей статус не изменился, у одной мыши снизился на 1 пункт, а у другой – на 2 пункта (табл. 2). У мышей с адресной доставкой конвулекса неизменным эпилептический статус остался только у одной мыши, у одной мыши эпилептический статус даже возрос на 1 пункт, у остальных эпилептический статус понизился на 1-2 пункта, что в сумме составило -4. При этом следует отметить, что

терапевтическая доза вальпроевой кислоты в этой группе была ниже в 26 раз, что свидетельствует о меньшей токсичности и большей эффективности лечения эпилепсии препаратом, адресно доставляющим вальпроевую кислоту в головной мозг.

Заключение

В заключение следует отметить, что у мышей, получавших конвулекс в низкой дозе с аптамерами, регистрировалась лучшая выживаемость на фоне развития эпилептического статуса через 2 дня после развития эпилептического статуса, самое высокое суммарное уменьшение эпилептического статуса и самое большое количество животных со снижением стадии эпилептического статуса в сравнении с группой контроля и группой мышей, леченных свободным конвулексом. При этом количество конвулекса в составе комплекса для его адресной доставки с помощью аптамеров было снижено в 26 раз. На основании полученных результатов можно сделать вывод о формировании научной платформы для разработки препаратов адресной доставки противоэпилептических препаратов, обладающих высокой эффективностью и низкой токсичностью.

Литература / References

1. Duncan JS, Sander JW, Sisodiya SM, Walker MC. Adult epilepsy. *Lancet*. 2006;(367):1087-1100.
2. Brooks-Kayal AR, Bath KG, Berg AT, Galanopoulou AS, Holmes GL, Jensen FE. Issues related to symptomatic and disease-modifying treatments affecting cognitive and neuropsychiatric comorbidities of epilepsy. *Epilepsia*. 2013;54(4):44-60.
3. Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017;(58):522-530.
4. Vezzani A, Pascente R, Ravizza T. Biomarkers of Epileptogenesis: The Focus on Glia and Cognitive Dysfunctions. *Neurochemical Research*. 2017;(42):2089-2098.
5. Johannessen CU, Johannessen SI. Valproate: past, present, and future. *CNS Drug Reviews*. 2003; (9): 199-216.

6. Lagace DC, O'Brien WT, Gurvich N, Nachtigal MW, Klein PS. Valproic acid: how it works. Or not. *Clinical Neuroscience Research*. 2004;(4):215-225.

7. Pulicherla K, Verma MK. Targeting therapeutics across the blood brain barrier (BBB), prerequisite towards thrombolytic therapy for cerebrovascular disorders – an overview and advancements. *AAPS PharmSciTech*. 2015;16(2):223-233.

8. Vajda FJ, Eadie MJ. The clinical pharmacology of traditional antiepileptic drugs. *Epileptic Disorders*. 2014;(16):395-408.

9. Dreifuss FE, Langer DH. Side effects of valproate. *The American Journal of Medicine*. 1988; (84):34-41.

10. Nanau RM, Neuman MG. Adverse drug reactions induced by valproic acid. *Clinical Biochemistry*. 2013;46(15):1323-1338.

11. Marimuthu C, Tang TH, Tominaga J, Tan SC, Gopinath SC. Single-stranded DNA (ssDNA) production in DNA aptamer generation. *Analyst*. 2012;(137): 1307-1315.

12. Давыдова АС, Воробьева МА, Веняминова АГ. Эсорт – аптамеры: новые инструменты для направленной доставки лекарственных препаратов в клетки. *ActaNatura*. 2011;(3):13-31. [Davydova AS, Vorobieva MA, Venyaminova AG. Escort – aptamers: new tools for targeted delivery of drugs into cells. *ActaNatura*. 2011;(3):13-31. (In Russian)]

13. Радко СП, Рахметова СЮ, Бодоев НВ, Арчаков АИ. Аптамеры как перспективные аффинные реагенты для клинической протеомики. *Биомедицинская химия*. 2007;53(1):5-24. [Radko SP, Rakhmetova SY, Bodoev NV, Archakov AI. Aptamers as promising affinity reagents for clinical proteomics. *Biomedical Chemistry*. 2007;53(1):5-24. (In Russian)]

14. Zamay GS, Ushenko VO, Zamay TN, Kolovskaya OS, Kichkailo AS. Aptamer penetrating through the blood brain barrier for antiepileptic drugs delivery. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 2019;17(1):23.

15. Racine R, Okujava V, Chipashvili S. Modification of seizure activity by electrical stimulation. III. Mechanisms. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*. 1972;(32):295-299.

Сведения об авторах

Замай Татьяна Николаевна, д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого; адрес: Российская Федерация, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1; тел.: +7(391)2201893; e-mail: zamay@yandex.ru

Дмитренко Диана Викторовна, д.м.н., профессор, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого; адрес: Российская Федерация, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1; тел.: +7(391)2201893; e-mail: mart2802@yandex.ru

Шнайдер Наталья Алексеевна, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник, д.м.н., Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого; адрес: Российская Федерация, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1; тел.: +7(812) 670 02 20; e-mail: NASchneider@yandex.ru

Народова Екатерина Андреевна, к.м.н., доцент, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого; адрес: Российская Федерация, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1; тел.: +7(391)2201893; e-mail: kattya_n2001@mail.ru

Народова Валерия Вячеславовна, д.м.н., профессор, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого; адрес: Российская Федерация, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1; тел.: +7(391)2201893; e-mail: narodova_v@mail.ru

Усолтцева Анна Александровна, м.н.с., Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого; адрес: Российская Федерация, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1; тел.: +7(391)2201893; e-mail: a.usoltseva@list.ru

Попов Игорь Сергеевич, студент, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого; адрес: Российская Федерация, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1; тел.: +7(391)2201893; e-mail: igor-popov-2000@mail.ru

Author information

Tatiana N. Zamay, Leading researcher, Dr.Biol.Sci., Associate Professor, Professor V. F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University; Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russian Federation 660022; Phone:+7(391)2201893; e-mail: zamay@yandex.ru

Diana V. Dmitrenko, Dr. Med. Sci., Professor, Professor V. F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University; Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russian Federation 660022; Phone:+7(391)2201893; e-mail: mart2802@yandex.ru

Natalia A. Shneider, Leading researcher, Dr.Med.Sci., Professor V. F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University; Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russian Federation 660022; Phone:+7(391)2201893; e-mail: NASchneider@yandex.ru

Ekaterina A. Narodova, Cand. Med. Sci., Associate Professor, Professor V. F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University; Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russian Federation 660022; Phone:+7(391)2201893; e-mail: kattya_n2001@mail.ru

Valeria V. Narodova, Dr. Med. Sci., Professor, Professor V. F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University; Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russian Federation 660022; Phone:+7(391)2201893; e-mail: narodova_v@mail.ru

Anna A. Usoltseva, Junior researcher, Professor V. F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University; Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russian Federation 660022; Phone:+7(391)2201893; e-mail: a.usoltseva@list.ru

Igor S. Popov, student, Professor V. F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University; Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, Russian Federation 660022; Phone:+7(391)2201893; e-mail: igor-popov-2000@mail.ru

Дата поступления: 26.02.2021

Дата рецензирования: 18.03.2021

Принята к печати: 31.02.2021

Received 26 February 2021

Revision Received 18 March 2021

Accepted 31 March 2021