

Изменение подвижности сперматозоидов человека в присутствии белково-пептидного комплекса

В.В. Евдокимов¹, Е.А. Ефремов¹, П.А. Елистратов², И.А. Ямсков²,
А.Ф. Аскеров², В.П. Ямскова³, В.Б. Туровецкий⁴

¹НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии»
Минздрава России; Россия, 105425 Москва, ул. 3-я Парковая, 51, стр. 1;

²ФГБУН «Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН»; Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 28;

³ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН», Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 26;

⁴Биологический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»;
Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

Контакты: Валерий Васильевич Евдокимов vvevdok@mail.ru

Цель исследования – выявить изменения подвижности сперматозоидов человека под действием белково-пептидного комплекса, выделенного из семенников крупного рогатого скота (*Bos taurus*).

Материалы и методы. Белково-пептидный комплекс выделяли из ткани семенников, полученных при забое крупного рогатого скота на мясокомбинатах Московской области. Сперматозоиды человека получали из эякулята общепринятым способом. Из полученного образца эякулята отбирали по 1 мл для опыта и контроля. В опытную пробирку вносили белково-пептидный комплекс в концентрации 10^{-8} , 10^{-9} и 10^{-12} мг/мл. Для каждой концентрации препарата ставили по 10–12 опытов. Оценивали общую и активную подвижность через 30 мин, 1 и 3 ч инкубации при комнатной температуре.

Результаты и заключение. Проведенные опыты показали, что в присутствии белково-пептидного комплекса подвижность сперматозоидов увеличивалась начиная с 30-й минуты на 10–30 % от исходной, это изменение сохранялось на протяжении 3 ч наблюдения. Величина изменения подвижности зависела от концентрации препарата: наиболее заметное увеличение отмечено при концентрации 10–12 мг/мл. Более высокие концентрации препарата не имели положительного эффекта в отношении подвижности сперматозоидов.

Ключевые слова: патозооспермия, белково-пептидный комплекс, сперматозоиды, мембранотропные гомеостатические тканеспецифические биорегуляторы, эксперимент

Для цитирования: Евдокимов В.В., Ефремов Е.А., Елистратов П.А. и др. Изменение подвижности сперматозоидов человека в присутствии белково-пептидного комплекса. Андрология и генитальная хирургия 2018;19(3):70–74.

DOI: 10.17650/2070-9781-2018-19-3-70-74

Changes in human sperm motility characteristics in the presence of protein-peptide complex

V.V. Evdokimov¹, E.A. Efremov¹, P.A. Elistratov², I.A. Yamskov², A.F. Askerov², V.P. Yamskova³, V.B. Turovetsky⁴

¹N.A. Lopatkin Scientific Research Institute of Urology and Interventional Radiology – branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia; Build. 1, 51 3rd Parkovaya St., Moscow 105425, Russia

²A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences; 28 Vavilova St., Moscow 119991, Russia;

³N.K. Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences; 26 Vavilova St., Moscow 119334, Russia;

⁴Faculty of Biology of Lomonosov Moscow State University; Build. 12, 1 Leninskie Gory, Moscow 119234

The study objective is to examine the changes in motility of human spermatozoa under the effect of a protein-peptide complex extracted from cattle testes (*Bos taurus*).

Materials and methods. The protein-peptide complex was extracted from testes tissue obtained during butchering of cattle at meat processing plants of the Moscow Region. Human spermatozoa were obtained from the ejaculate in the usual way. From the ejaculate sample, 1 ml was collected for the experiment and control. The protein-peptide complex was added to a test tube in concentrations of 10^{-8} , 10^{-9} , and 10^{-12} mg/ml. For every concentration, 10–12 experiments were performed. General and active motility were evaluated after 30 min, 1 and 3 hours of incubation at room temperature.

Results and conclusion. The experiments have shown that in the presence of the protein-peptide complex, spermatozoa motility increased by 10–30 % relative to the initial value at 30 minutes, and this change persisted for 3 hours of observation. The change depended on the complex concentration: the largest increase was observed at 10–12 mg/ml. Higher complex concentrations did not have a positive effect on spermatozoa motility.



Key words: pathozoospermia, protein-peptide complex, spermatozoa, membranotropic homeostatic tissue-specific bioregulators, experiment

For citation: Evdokimov V.V., Efremov E.A., Elistratov P.A. et al. Changes in human sperm motility characteristics in the presence of protein-peptide complex. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2018;19(3):70–74.

Введение

Современная демографическая ситуация в России характеризуется падением рождаемости, и эта тенденция, по оценкам демографов, сохранится на протяжении нескольких лет. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), 10–15 % супружеских пар в разных странах бесплодны. В России, по данным ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России, это число достигает 17 %, т. е. более 4 млн мужчин в стране страдают бесплодием различных форм [1–6].

В последние годы нарушения репродуктивной функции у мужчин приобрели особую медицинскую и социальную значимость в связи с прогрессирующим снижением фертильных свойств сперматозоидов [7–9]. Нарушения фертильности оцениваются как полиэтиологическое состояние, развитие которого может быть обусловлено наличием патологических изменений в органах половой системы (варикоцеле, простатит, инфекции, передающиеся половым путем, крипторхизм, гипогонадизм и др.), а также влиянием внешних факторов: курения, приема алкоголя, гиподинамии, ожирения, электромагнитного излучения, загрязнения окружающей среды, профессиональных вредностей [10–14]. Все эти факторы могут действовать одновременно, вызывая изменения репродуктивной и сексуальной функций, гормонального профиля. По всей вероятности, совокупность этих факторов объясняет высокую частоту идиопатических форм бесплодия, достигающую до 30–50 % в структуре мужской infertility, что вызывает трудности при диагностике и выборе лечебной тактики [15–17].

В отличие от женского бесплодия, диагностика и лечение которого приносит ощутимые результаты, мужское бесплодие остается одной из важных проблем современной медицины. Коррекция нарушений мужской фертильности не всегда успешна. Для изменения структурно-функционального состояния сперматозоидов используют ряд гормональных препаратов, витамины, микроэлементы, антиоксиданты и др. Однако их эффект не всегда удовлетворяет и пациента, и врача. Лечение идиопатической формы бесплодия во многом зависит от опыта андролога и репродуктолога [18, 19].

В ряде экспериментов изучена эффективность применения регуляторных пептидов (семакса и селанка, а также целой группы синтезированных олигопептидов) для увеличения подвижности сперматозоидов.

Некоторые из регуляторных пептидов при добавлении в раствор эякулята обладали ярко выраженным действием — увеличивали как активную, так и общую подвижность сперматозоидов [20].

Из литературных источников известно, что вещества белково-пептидной природы, находящиеся во внеклеточном пространстве различных тканей млекопитающих и именуемые мембранотропными гомеостатическими тканеспецифическими биорегуляторами, обладают тканеспецифическим биологическим действием в низких концентрациях [21, 22]. Наибольший интерес представлял биорегулятор, выделенный из ткани семенников крупного рогатого скота, который в низких дозах оказывал протекторное действие на ткани и клетки семенников мыши в условиях органного роллерного культивирования *in vitro* [23].

В этой связи важны поиск эффективных препаратов, воздействующих на основные параметры фертильности, и их исследование в эксперименте. **Цель исследования** — выявить изменения подвижности сперматозоидов человека под действием белково-пептидного комплекса, выделенного из семенников крупного рогатого скота (*Bos taurus*).

Материалы и методы

В данной работе исследовали белково-пептидный комплекс (БПК), выделенный из ткани семенников, которые были получены при забое крупного рогатого скота на мясокомбинатах Московской области. Ткань семенников разрезали на небольшие фрагменты, помещали в экстрагирующий раствор, содержащий NaCl, KCl, CaCl₂ и HEPES, и инкубировали в течение нескольких часов при температуре +4° С. Полученный экстракт фильтровали и центрифугировали при 3000 г в течение 30 мин, после чего к нему добавляли сухой сернокислый аммоний при постоянном перемешивании до образования 100 % насыщенного раствора соли, оставляли на несколько суток при температуре +4° С, после чего центрифугированием при 12000 г в течение 30 мин разделяли фракции супернатанта и осадка. Фракцию осадка диализовали против трис-буферного раствора (0,01 моль/л, pH 7,4) до полного удаления ионов сульфата аммония, затем разделяли методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием хроматографа высокого давления Agilent 1200 (США). Фракцию, содержащую целевой БПК, собирали и разбавляли дистиллированной водой соответствующим образом (1:10),

Изменение подвижности сперматозоидов в ходе эксперимента (прирост (%) относительно исходного уровня)
Changes in sperm motility during the experiment (increase (%) relative to baseline)

Показатель	Исходно Baseline value	Через 30 мин 30 min after the start of experiment			Через 1 ч 1 hour after the start of experiment		
		БПК-12 PPC-12	БПК-9 PPC-9	БПК-8 PPC-8	БПК-12 PPC-12	БПК-9 PPC-9	БПК-8 PPC-8
09.03.2017							
Подвижность активной фракции сперматозоидов The mobility of the active fraction of the sperm	100	131	100	100	131	100	118
Общая подвижность сперматозоидов Total sperm motility	100	106	93	100	110	96	110
10.03.2017							
Подвижность активной фракции сперматозоидов The mobility of the active fraction of the sperm	100	80	20	30	20	40	10
Общая подвижность сперматозоидов Total sperm motility	100	88	55	72	55	55	22

Примечание. БПК – белково-пептидный комплекс. Цифра обозначает степень разведения.
Note. PPC – protein-peptide complex. The number indicates the degree of dilution.

получая таким образом растворы БПК с 10-кратным последовательным разбавлением от 1 до 15 степени, в каждый раствор БПК добавляли также хлорид кальция до его конечной концентрации 1 ммоль/л.

Исследования проводили на сперматозоидах человека из эякулята, полученного общепринятым способом. После разжижения через 40–60 мин эякулят изучали на микроскопе Amplival (Carl Zeiss, Германия) в проходящем свете при увеличении в 400 раз. Подвижность сперматозоидов и другие параметры эякулята оценивали по рекомендациям ВОЗ 5-го пересмотра [6]. Эксперименты проводили при комнатной температуре (20–22° С). Из полученного эякулята отбирали по 1 мл для опытного и контрольного образцов. В опытную пробирку вносили БПК в концентрации 10⁻⁸, 10⁻⁹ и 10⁻¹² мг/мл. Для каждой концентрации препарата ставили по 10–12 опытов. Общую и активную подвижность оценивали через 30 мин, 1 и 3 ч инкубации при 20–22° С. Определяли также сохранность жизнеспособности нормальных сперматозоидов через 24 и 48 ч инкубации образцов эякулята с БПК при 20–22° С.

Полученные цифровые данные представлены в виде средних арифметических значений и их среднеквадратических ошибок. Результаты экспериментов обрабатывали статистически с использованием критерия

Стьюдента. Различия параметров считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Подвижность сперматозоидов в присутствии БПК, выделенного из ткани семенников крупного рогатого скота, значительно изменялась (см. табл.). Установлено увеличение подвижности сперматозоидов уже после 30 мин инкубации и сохранение этого уровня на протяжении 3 ч наблюдения, при этом величина прироста подвижности варьировала в интервале 10–30 % от исходного уровня. Более заметные изменения отмечены в активно-подвижной фракции сперматозоидов; общая подвижность увеличивалась в пределах 10 %. Через 24 ч подвижность сперматозоидов была близка к исходной, количество нормальных форм сперматозоидов и живых клеток оставалось без изменений. Величина изменения подвижности зависела от концентрации препарата: наиболее заметный рост подвижности происходил при добавлении в опытный образец эякулята БПК с концентрацией 10⁻¹² мг/мл. Более высокие концентрации препарата не имели положительного эффекта в отношении подвижности сперматозоидов.

Изменение подвижности сперматозоидов на фоне применения БПК можно объяснить следующим образом.

Известно, что подвижность сперматозоидов обеспечивается за счет энергии гликолиза, одним из ферментов которого является глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, прочно связанная с фиброзным слоем жгутика сперматозоида. Возрастание подвижности сперматозоидов, возможно, обусловлено действием агентов, уменьшающих избыточное количество активных форм кислорода. На подвижность отрицательно влияет избыток активных форм кислорода, возникающий при заболеваниях органов репродуктивной системы мужчин. Выявленный эффект усиления подвижности сперматозоидов может быть связан с активацией метаболических путей, приводящей к увеличению содержания глутатиона, восстановлению

активных центров глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, к повышению активности фермента.

Заключение

В присутствии БПК подвижность сперматозоидов увеличивалась начиная с 30-й минуты на 10–30 % от исходной, это изменение сохранялось на протяжении 3 ч наблюдения. Величина изменения подвижности зависела от концентрации препарата: наиболее заметное увеличение отмечено при концентрации 10^{-12} мг/мл. Более высокие концентрации препарата не имели положительного эффекта в отношении подвижности сперматозоидов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Быков В.Л. Сперматогенез у мужчин в конце XX века (обзор литературы). Проблемы репродукции 2000;6(1):6–13. [Bykov V.L. Spermatogenesis in men in the late twentieth century (literature review). *Problemy reproduksii = Russian Journal of Human Reproduction* 2000;6(1):6–13. (In Russ.)].
2. Dohle G.R., Diemer T., Giwercmanet A. et al. Мужское бесплодие. Пер. К.А. Ширанова. Европейская ассоциация урологов, 2010. [Dohle G.R., Diemer T., Giwercman A. et al. Guidelines on male infertility. Transl. by K.A. Shiranov. European Association of Urology, 2010. (In Russ.)].
3. Иванов Н.В., Ворохобина Н.В. Астенозооспермия: причины, алгоритм дифференциальной диагностики и методы коррекции. Новые возможности применения ацетил-L-карнитина. Проблемы репродукции 2012;(5):69–73. [Ivanov N.V., Vorokhobina N.V. Asthenozoospermia: aetiology, differential diagnosis and methods of correction. New opportunities of acetyl-L-carnitine use. *Problemy reproduksii = Russian Journal of Human Reproduction* 2012;(5):69–73. (In Russ.)].
4. Кулаков В.И. Вспомогательные репродуктивные технологии – настоящее и будущее. М.: Медицинское информационное агентство, 2005. С. 11–14. [Kulakov V.I. Assisted reproductive technologies – present and future. Moscow: Medical Media Agency, 2005. Pp. 11–14. (In Russ.)].
5. Рождаемость и планирование семьи в России. История и перспективы. Под ред. И.А. Троицкой, А.А. Авдеева. М., 2011. 177 с. [Fertility and family planning in Russia. History and perspectives. Ed. by I.A. Troitskaia, A.A. Avdeev. Moscow, 2011. 177 p. (In Russ.)].
6. Келлэт Е.П., Корнеева И.Е., Шурашлина А.В. Бесплодие неясного генеза: фокус современных научных исследований (обзор литературы). Проблемы репродукции 2010;16(1):32–5. [Kellét E.P., Korneeva I.E., Shurshalina A.V. Unexplained infertility: the focus of current scientific research (a review). *Problemy reproduksii = Russian Journal of Human Reproduction* 2010;16(1):32–5. (In Russ.)].
7. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. 5-е изд. М., 2012. 291 с. [WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edn. Moscow, 2012. 291 p. (In Russ.)].
8. Овчинников Р.И., Гамидов С.И., Попова А.Ю. и др. Причины репродуктивных потерь у мужчин – фрагментация ДНК сперматозоидов. Русский медицинский журнал 2015;23(11):634–8. [Ovchinnikov R.I., Gamidov S.I., Popova A.Yu. et al. Cause of reproductive losses in men is the fragmentation of sperm DNA. *Russky meditsinsky zhurnal = Russian Medical Journal* 2015;23(11):634–8. (In Russ.)].
9. Чен П.Т., Гоулдстейн М.М., Роузенвэкс З. Секреты репродуктивной медицины: вопросы и ответы, раскрывающие секреты репродуктивной медицины. М.: Медпресс-информ, 2006. 448 с. [Chan P.T., Goldstein M.M., Rosenwaks Z. Reproductive medicine secrets. Moscow: Medpress-inform, 2006. 448 p. (In Russ.)].
10. Курило Л.Ф. Система тестирования факторов, повреждающих женские и мужские гаметы и гонады. Гигиена и санитария 2011;(5):72–8. [Kurilo L.F. Testing system for factors damaging female and male gametes and gonads. *Gigiena i sanitariya = Hygiene and Sanitation* 2011;(5):72–8. (In Russ.)].
11. Тюзиков И.А., Калинин С.Ю., Ворслов Л.О., Греков Е.А. Оптимизация клинического применения комплекса L-карнитина и ацетил-L-карнитина в современной фармакотерапии идиопатического мужского бесплодия. Эффективная фармакотерапия 2013;(1):44–9. [Tuzikov I.A., Kalinchenko S.Yu., Vorslov L.O., Grekov E.A. Optimization of the clinical application of the complex of L-carnitine and acetyl-L-carnitine in modern pharmacotherapy of idiopathic male infertility. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy* 2013;(1):44–9. (In Russ.)].
12. Baazeem A., Belzile E., Ciampi A. et al. Varicocele and male factor infertility treatment: a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair. *Eur Urol* 2011;60(4):796–808. DOI: 10.1016/j.eururo.2011.06.018. PMID: 21733620.
13. Naber K.G., Bishop M.C., Bjerklund-Johansen T.E. et al. Guidelines for the management of urinary and male genital tract infections. European Association of Urology, 2007. 126 p. Available at: <http://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-Male-UTI-2007.pdf>.
14. Пашкова Е.Ю., Калинин С.Ю. Мужское бесплодие в XXI веке – реалии и перспективы. Новые возможности использования комбинированной стимулирующей терапии гонадотропинами. Эффективная фармакотерапия 2013;(1):26–31. [Pashkova E.Yu., Kalinchenko S.Yu. Male infertility in the twenty-first century – realities and perspectives. New possibilities of using combined stimulating therapy with gonadotropins. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy* 2013;(1):26–31. (In Russ.)].
15. Жуков О.Б., Евдокимов В.В., Жуков А.А. и др. Новая стратегия профессионального медицинского сопровождения супружеской пары при бесплодии. Андрология и генитальная хирургия 2013;14(2):74–81. [Zhukov O.B., Evdokimov V.V., Zhukov A.A. et al. A new strat-

- egy for professional medical support couples with infertility. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2013;14(2):74–81. (In Russ.).
16. Резолюция II Евразийского андрологического конгресса «Стратегические вопросы репродуктивного здоровья мужчин и демографические процессы в государствах-членах Евразийского экономического сообщества». Алматы, 27 мая 2010 г. *Андрология и генитальная хирургия* 2010;11(4):95–6. [Resolution of the II Eurasian Andrological Congress “Strategic issues of men’s reproductive health and demographic processes in the member states of the Eurasian economic community”. Almaty, 27 May 2010. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2010;11(4):95–6. (In Russ.).]
17. Виноградов И.В., Габлия М.Ю. Роль мужского фактора при анализе неудач в протоколах ВРТ. *Андрология и генитальная хирургия* 2011;(2):121. [Vinogradov I.V., Gabliya M.Yu. Role of the male factor in the analysis of failures in the protocols of ART. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2011;(2):121. (In Russ.).]
18. Андрология. Мужское здоровье и дисфункция репродуктивной системы. Под ред. Э. Нишлага, Г. Бере. М.: Медицинское информационное агентство, 2005. С. 450. [Andrology. Male reproductive health and dysfunction. Ed. by E. Nieschlag, H.M. Behre. Moscow: Medical information agency, 2005. P. 450. (In Russ.).]
19. Проскурин А.А., Голубкин Е.А., Поливин П.А., Казарян Э.Э. Сравнительная оценка эффективности комплексной терапии идиопатического бесплодия. *Проблемы репродукции* 2013;19(6):65–6. [Proskurin A.A., Golubkin E.A., Polivin P.A., Kazarian E.E. The comparative assessment of efficacy of idiopathic infertility therapy. *Problemy reproduksii = Russian Journal of Human Reproduction* 2013;19(6):65–6. (In Russ.).]
20. Евдокимов В.В., Захариков С.В., Андреева Л.А. и др. Влияние регуляторных пептидов на подвижность сперматозоидов человека in vitro. *Экспериментальная и клиническая урология* 2016;(2):67–9. [Evdokimov V.V., Zakharikov S.V., Andreeva L.A. Influence of regulatory peptides on the mobility of human sperm cells in vitro. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya urologiya = Experimental and Clinical Urology* 2016;(2):67–9. (In Russ.).]
21. Ямскова В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. Наноразмерные биорегуляторы тканей глаза млекопитающих как основа для фармакологических препаратов нового поколения. М.: Макс Пресс, 2009. 82 с. [Yamskova V.P., Krasnov M.S., Yamskov I.A. Nanoscale bioregulators of mammalian eye tissues as a basis for new generation of medicament. Moscow: Maks Press, 2009. 82 p. (In Russ.).]
22. Ямскова В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. Новые экспериментальные и теоретические аспекты в биорегуляции. Механизм действия мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2012. 127 с. [Yamskova V.P., Krasnov M.S., Yamskov I.A. New experimental and theoretical aspects of bioregulation. The mechanism of action of membranotropic homeostatic tissue-specific bioregulators. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2012. 127 p. (In Russ.).]
23. Краснов М.С., Ямскова В.П., Березин Б.Б. и др. Исследование биорегулятора, выделенного из семенников крыс, на модели роллерного органотипического культивирования семенников мыши in vitro. *Клеточные технологии в биологии и медицине* 2014;(1):63–7. [Krasnov M.S., Yamskova N.V., Berезin B.B. et al. Analysis of a bioregulator isolated from rat testes in roller organotypic culture of mouse testes in vitro. *Cell Technologies in Biology and Medicine* 2014;(1):63–7. (In Russ.).]

Вклад авторов

В.В. Евдокимов: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, написание текста статьи;
Е.А. Ефремов: получение данных для анализа;
П.А. Елистратов: написание текста статьи;
И.А. Ямсков: анализ полученных данных, написание текста статьи;
А.Ф. Аскеров: анализ полученных данных;
В.П. Ямскова: обзор публикаций по теме статьи;
В.Б. Туровецкий: обзор публикаций по теме статьи.

Authors' contributions

V.V. Evdokimov: developing the research design, obtaining data for analysis, article writing;
E.A. Efremov: obtaining data for analysis,
P.A. Elistratov: article writing;
I.A. Yamskov: analysis of the obtained data, article writing;
A.F. Askerov: analysis of the obtained data;
V.P. Yamskova: reviewing of publications of the article's theme;
V.B. Turovetsky: reviewing of publications of the article's theme.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.В. Евдокимов / V.V. Evdokimov: <https://orcid.org/0000-0001-5673-4810>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 20.02.2018. Принята к публикации: 10.03.2018.

Article received: 20.02.2018. Accepted for publication: 10.03.2018.