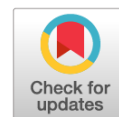


УДК 615.03

DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ630012>

ДЕКСАМЕТАЗОН-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ «НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ»

Т.В. Тютюнник, В.М. Кудринская, Д.А. Обухова, В.А. Майстренко, Н.С. Пестерева

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Для цитирования: Тютюнник Т.В., Кудринская В.М., Обухова Д.А., Майстренко В.А., Пестерева Н.С. Дексаметазон-индуцированные изменения профиля экспрессии генов «нейровоспаления» // Медицинский академический журнал. 2024. Т. 24. № 3. С. 133–138. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ630012>

Рукопись получена: 05.04.2024

Рукопись одобрена: 23.07.2024

Опубликована online: 13.11.2024

Обоснование. Глюкокортикоиды играют важную роль в развитии стрессорного ответа организма. Синтетические глюкокортикоиды, такие как дексаметазон, широко применяются в медицине благодаря их противовоспалительным эффектам. Однако существуют данные, что лекарственные препараты на основе глюкокортикоидов, применяемые в достаточно больших дозах, могут вызывать провоспалительные эффекты, воздействуя преимущественно на гиппокамп в центральной нервной системе как на наиболее пластичную структуру мозга. Важно отметить, что доза, схема и время введения могут повлиять на эффекты, оказываемые глюкокортикоидами, и именно поэтому важной медико-биологической задачей является выбор оптимальных параметров введения глюкокортикоидов для достижения наиболее эффективных результатов лечения.

Цель — изучить влияние периферического введения синтетического глюкокортикоида дексаметазона в дозе 8 мг/кг на развитие нейровоспаления в гиппокампе крыс на разных сроках после введения.

Материалы и методы. В эксперименте использовали 32 половозрелых самца крыс Wistar, распределенных на 8 групп по 4 головы в каждой. Животным вводили дексаметазон в дозе 8 мг/кг и производили декапитацию на разных сроках (через 1, 3, 9, 12, 18, 24, 48 ч после введения), группа К — контрольная, животным вводили 0,9 % раствор натрия хлорида. Далее методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени производили анализ экспрессии генов «нейровоспаления».

Результаты. В настоящем исследовании мы обнаружили увеличение экспрессии генов провоспалительных цитокинов *AIF1* (IBA-1) и *IL-1β* через 12 и *TNF-α* через 24 ч после введения дексаметазона в дозе 8 мг/кг, что может свидетельствовать о нейровоспалительном действии дексаметазона в данной дозе. При этом стоит отметить, что уровень экспрессии гена *NF-κB* остался неизменным, возможно, из-за активации компенсаторных механизмов для контроля воспаления или стресса.

Заключение. Повышение мРНК маркеров воспаления *IL-1β*, *TNF-α* и *AIF1* через 12 ч после введения дексаметазона крысам в дозе 8 мг/кг в гиппокампе может свидетельствовать о переключении эффекта этого препарата с противовоспалительного на провоспалительный, что следует учитывать при назначении дексаметазона при лечении ряда заболеваний.

Ключевые слова: дексаметазон; нейровоспаление; цитокины; гиппокамп.

DEXAMETHASONE-INDUCED CHANGES IN THE EXPRESSION PROFILE OF “NEUROINFLAMMATORY” GENES

Tatiana V. Tiutiunnik, Valentina M. Kudrinskaya, Daria A. Obukhova, Victoria A. Maystrenko, Nina S. Pestereva

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

For citation: Tiutiunnik TV, Kudrinskaya VM, Obukhova DA, Maystrenko VA, Pestereva NS. Dexamethasone-induced changes in the expression profile of “neuroinflammatory” genes. *Medical Academic Journal*. 2024;24(3):133–138. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ630012>

Received: 05.04.2024

Accepted: 23.07.2024

Published online: 13.11.2024

BACKGROUND: Glucocorticoids play an important role in the development of the stress response in the organism. Synthetic glucocorticoids such as dexamethasone are widely used in medicine due to their anti-inflammatory effects. However, there is evidence that glucocorticoid-based drugs used in sufficiently high doses can induce pro-inflammatory effects by affecting predominantly the hippocampus in the central nervous system as the most plastic brain structure. It is important to note that the dose, route and timing of administration can affect the effects of glucocorticoids, and it is therefore an important biomedical task to choose the optimal parameters of glucocorticoid administration in order to achieve the most effective treatment results.

AIM: The aim of our study was to investigate the effect of peripheral administration of a synthetic glucocorticoid, dexamethasone, at a dose of 8 mg/kg on the development of neuroinflammation in the rat hippocampus at different periods after administration.

MATERIALS AND METHODS: Thirty-two sexually mature male Wistar rats distributed into 8 groups of 4 animals each were used in the experiment. The animals were injected with dexamethasone at a dose of 8 mg/kg and decapitated for different periods (1, 3, 9, 12, 18, 24, 48 hours — time of decapitation after administration), group K — control group with saline injection). Further, the cytokine profile expression was analyzed by real-time reverse transcription polymerase chain reaction method.

RESULTS: In this study, we found an increase in the expression of proinflammatory cytokines *AIF1* (IBA-1) and *IL-1 β* after 12 and *TNF- α* after 24 hours after dexamethasone administration at a dose of 8 mg/kg, which may indicate a neuroinflammatory effect of dexamethasone at this dose. It should be noted that the level of *NF- κ B* gene, a marker of inflammation, remained unchanged, possibly due to the activation of compensatory mechanisms to control inflammation or stress.

CONCLUSIONS: The increase in mRNA of inflammatory markers *IL-1 β* , *TNF- α* and *AIF1*, in the hippocampus after 12 hours after single dexamethasone administration to rats at a dose of 8 mg/kg may indicate a switch of the effect of this drug from antiinflammatory to proinflammatory, which should be taken into account when dexamethasone is used such a treatment during several diseases.

Keywords: dexamethasone; neuroinflammation; cytokines; hippocampus.

Обоснование

Глюкокортикоиды (ГК) — важный компонент адаптивного ответа организма на стрессогенные стимулы, их действие реализуется через гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось. Типичная стрессовая реакция сопровождается повышением уровня ГК, которые оказывают противовоспалительное, иммуносупрессивное, противоаллергическое и антиоксическое действие на организм. Противовоспалительные эффекты ГК широко используют в клинической практике. Известно, что фармакологические агенты на основе ГК (дексаметазон, преднизолон и др.) применяют как противовоспалительные препараты. Например, при рассеянном склерозе суточная доза дексаметазона может достигать 30 мг/кг, а при однократном введении обычно используют дозу 5–12 мг/кг [1]. Однако ГК могут вызывать негативные побочные эффекты, в том числе индуцировать нейровоспаление [2]. Считается, что провоспалительные эффекты ГК могут инициировать или интенсифицировать процесс нейродегенерации.

Основная структура центральной нервной системы, на которую действуют ГК, — гиппокамп — область мозга, отвечающая за обучение и память. Считается, что гиппокамп наиболее уязвим для нейровоспаления и нейродегенерации из-за самой высокой плотности рецепторов ГК в мозге, что потенциально обуславливает высокую чувствительность клеток данной структуры к стрессу. Данные, описывающие про- и противовоспалительное действие ГК, противоречивы. В зависимости от дозы, способа и схемы введения эффекты ГК могут быть диаметрально противоположными. Например, длительное повышение уровня ГК, в том числе за счет введения синтетических аналогов ГК, активирует нейровоспаление в гиппокампе, изменяя и цитокиновый профиль, модулируя уровень экспрессии *AIF1*(IBA1), *IL-1 β* , *TNF- α* и *NF- κ B*, который, в свою очередь, контролирует экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза

и клеточного цикла [2]. В высоких концентрациях ГК могут оказывать иммуносупрессивное действие. Большая часть долгосрочных противовоспалительных эффектов ГК может быть вызвана важным негативным регуляторным механизмом, называемым трансрепрессией, а также косвенным воздействием ГК через повышение уровня эндоканнабиноидов, которые, как известно, оказывают комплексное влияние на воспаление. Все это может приводить к ингибированию генной экспрессии цитокинов в периферических органах и мозге при остром и/или кратковременном воздействии ГК [2]. Таким образом, имеющихся данных недостаточно для понимания механизмов действия ГК на клетки центральной нервной системы.

Цель исследования — изучение влияния периферического введения синтетического ГК дексаметазона в дозе 8 мг/кг на развитие процесса нейровоспаления в гиппокампе крыс на разных сроках после введения.

Материалы и методы

Животные

Во всех экспериментах использовали взрослых самцов крыс Вистар (180 ± 20 г). Крысы были приобретены в питомнике «Рапполово» (Ленинградская область, Россия). Животных содержали в клетках по 4–5 особей в каждой, в помещении с контролируемыми условиями (температура 24 ± 1 °C, влажность 45–65 %, цикл свет/темнота 12 ч). Корм в гранулах и водопроводная вода были доступны *ad libitum* в течение всего экспериментального периода.

Все эксперименты проводили в соответствии с институциональными рекомендациями и Руководством по уходу и использованию лабораторных животных Национальных институтов здоровья (NIH), а также с национальным законодательством (Минздрав России № 267 от 19 июня 2003 г.; Руководство по ис-

пользованию лабораторных животных, Москва, 2005).

Схема эксперимента

32 половозрелых самца крыс методом блочной рандомизации распределили на 8 групп по 4 головы в каждой. Животные получали внутривентральную инъекцию дексаметазона в дозе 8 мг/кг. Далее проводили декапитацию на разных сроках (через 1, 3, 9, 12, 18, 24, 48 ч после введения), группа К — контрольная, животным внутривентрально вводили 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Через разные сроки после инъекции крыс наркотизировали внутривентральным введением Золетила 100 (35 мг/кг) и обезглавливали гильотиной (Open-Science AE1601, RPC OpenScience Ltd, Россия). Мозг крыс быстро извлекали и брали образцы гиппокампа. Области мозга идентифицировали с помощью атласа мозга [3]. Все собранные ткани немедленно замораживали и хранили при температуре -80°C до анализа.

Выделение мРНК и обратная транскрипция

Тотальную мРНК выделяли из замороженных тканей (50–100 мг) с помощью набора ExtractRNA (#BC032, Евроген, Россия), следуя протоколам производителя для фенол-хлороформной экстракции. Концентрацию образцов РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop2000 (Thermo Scientific, США), а чистоту проверяли по соотношению оптической плотности $A_{260}/A_{280} > 1,9$ для каждого образца. После этого образцы хранили при температуре -80°C до дальнейшего анализа.

Для синтеза комплементарной ДНК использовали в общей сложности 2 мкг мРНК. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием коммерческого набора реагентов Reverta (#SK022S, Евроген, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Полученную комплементарную ДНК хранили при температуре -20°C для дальнейшего использования.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Количественную полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили с использованием системы BioRad CFX96 Real-TimeSystem (Bio-Rad Laboratories, США) и коммерческого набора реагентов qPCRmix-HSSYBR-5x (#PK147L, Евроген, Россия). Последовательности праймеров представлены в таблице. Программа полимеразной цепной реакции включала начальную денатурацию при 95°C в течение 5 мин, 35 циклов реакции, состоящих из 20 с денатурации (94°C), 40 с отжига (60°C) и 50 с элонгации (72°C). В качестве референсных генов для контроля нормализации были выбраны гены пептидил-пролил-изомеразы А (PPI) и 18S. Для определения

относительных уровней экспрессии генов использовали метод delta-delta CT.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью программы GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, США). Все данные представлены в виде медианы и экспериментальных точек. Статистические различия проверяли с помощью непараметрического теста Краскела — Уоллиса, с последующим применением post-hoc-теста Данна. Порог статистической значимости $p < 0,05$, H — статистика теста Краскела — Уоллиса.

Результаты и обсуждение

Известно, что прием высоких доз кортикостерона увеличивал экспрессию генов, связанных с воспалением, таких как мРНК *AIF1* (IBA-1), в гиппокампе [4].

Действительно, оказалось (см. рисунок, а), что в клетках гиппокампа содержание мРНК *AIF1* (IBA-1) ($H = 17,45$, $p = 0,0147$) в группе 12 было выше чем в контрольной группе К в 3,2 раза ($p < 0,0096$). Похожий результат наблюдали и для *IL-1 β* (см. рисунок, б): содержание мРНК данного гена ($H = 19,46$, $p = 0,0069$) в группе 12 было выше чем в группе 48 в 4 раза ($p < 0,0146$). Так, на 12-м часу после введения дексаметазона в дозе 8 мг/кг наблюдается максимальное увеличение экспрессии мРНК *AIF1*

Таблица / Table

Праймеры, использованные для полимеразной цепной реакции

Primers used for real-time polymerase chain reaction

Имя	Последовательность праймеров (5' → 3')
<i>PPI</i>	F: GGATTGGCTATAAGGGTTC R: GTTGTCCACAGTCGGAGA
<i>18S</i>	F: ACGGACCAGAGCGAAAGCAT R: TGTCAATCCTGTCCGTGTCC
<i>IL-1β</i>	F: TCTTCGAGGCACAAGGCA R: AGAGGTCCAGGTCCTGGAA
<i>AIF1</i>	F: GAAGCGAATGCTGGAGAAAC R: CCTCCAATTAGGGCAACTCA
<i>TNF-α</i>	F: CCAGGTTCTCTTCAAGGGACAA R: CTCCTGGTATGAAATGGCAAATC
<i>NF-κB</i>	F: CATGCGTTTCCGTTACAAGTGCGA R: TGGGTGCGTCTTAGTGGTATCTGT

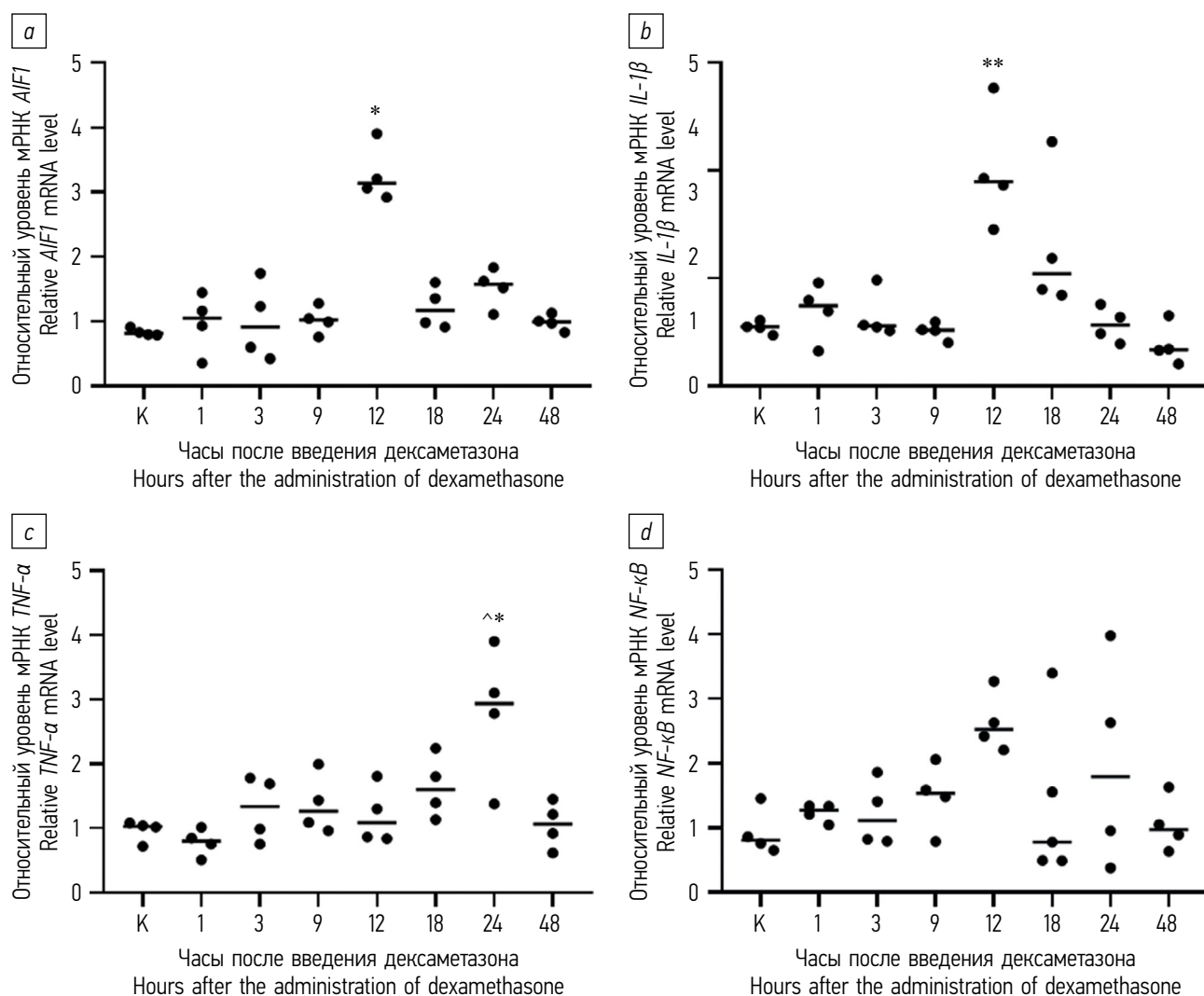


Рисунок. Уровень мРНК генов *AIF1* (a), *IL-1β* (b), *TNF-α* (c), *NF-κB* (d) в гиппокампе крыс, получавших однократную внутрибрюшную инъекцию дексаметазона в дозе 8 мг/кг, на разных сроках после введения. По оси ординат показано относительное изменение экспрессии ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Данные представлены в виде медианы и экспериментальных точек. * $p < 0,01$ относительно контрольной группы; ** $p < 0,05$ относительно группы 48; ^* $p < 0,05$ относительно группы 1 (тест Краскела – Уоллиса, post-hoc-тест Данна)

Figure. The mRNA of *AIF1* (a), *IL-1β* (b), *TNF-α* (c) and *NF-κB* (d) levels in the hippocampus of rats receiving a single intraperitoneal injection of dexamethasone at a dose of 8 mg/kg at different time points after administration. The ordinate axis shows the relative value of the change in expression ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Data are presented as median and experimental points. * $p < 0.01$ relative the control group; ** $p < 0.05$ relative the group 48; ^* $p < 0.05$ relative the group 1 (Kruskal–Wallis test, post hoc Dunn’s test)

(IBA-1), что может говорить о пролонгированном провоспалительном действии дексаметазона в такой однократной высокой дозе или о «переключении» противовоспалительного действия на провоспалительное [5].

Более того, в микроглии гиппокампа, выделенной из головного мозга крыс, подвергшихся воздействию высоких уровней кортикостерона, наблюдалась повышенная экспрессия провоспалительных цитокинов, таких как *TNF-α* [6].

Действительно, похожие результаты были в нашем исследовании при анализе изменения экспрессии *TNF-α*. Наблюдали увеличение

экспрессии мРНК *TNF-α* ($H = 15,56$, $p = 0,0295$) (см. рисунок, c) на 24-м часе после введения относительно группы 1 в 3,4 раза ($p = 0,0223$). Таким образом, введение дексаметазона в дозе 8 мг/кг приводит к пику экспрессии данного провоспалительного гена на 24-м часе, что коррелирует с работой [7].

Удивительно, однако уровень мРНК провоспалительного гена *NF-κB* не менялся на разных сроках после введения дексаметазона (см. рисунок, d), хотя уровень экспрессии напрямую связан со взаимодействием с ГК, и введение их малых доз способствует уменьшению экспрессии *NF-κB* [2].

Заключение

Через 12 ч после однократного внутривенного введения дексаметазона в дозе 8 мг/кг в гиппокампе крыс было выявлено повышение экспрессии провоспалительных факторов IL-1 β , TNF- α и AIF1 — молекулярных биомаркеров нейровоспаления.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания FGWG-2022-0008.

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

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Наибольший вклад распределен следующим образом: *Т.В. Тютюнник* — методология, валидация, исследование, написание статьи; *В.М. Кудринская* — визуализация данных, редактирование статьи; *Д.А. Обухова* — проведение полимеразной цепной реакции в реальном времени, редактирование статьи; *В.А. Майстренко* — статистический анализ, редактирование статьи; *Н.С. Пестерева* — методология, концептуализация, редактирование статьи.

Additional information

Funding source. The work was performed under the state assignment FGWG-2022-0008.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the study, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the article, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the study.

Personal contribution of each author: *T.V. Tiutun-nik* — methodology, validation, investigation, writing; *V.M. Kudrinskaya* — data visualization, editing; *D.A. Obukhova* — real-time polymerase chain reaction, editing; *V.A. Maystrenko* — statistical analysis, editing; *N.S. Pestereva* — conceptualization, editing.

Список литературы

- De Keyser J., Zwanikken C.M., Zorgdrager A., et al. Treatment of acute relapses in multiple sclerosis at home with oral dexamethasone: a pilot study // *J Clin Neurosci*. 1999. Vol. 6, N 5. P. 382–384. doi: 10.1054/jocn.1997.0086

- Bolshakov A.P., Tret'yakova L.V., Kvichansky A.A., Gulyaeva N.V. Glucocorticoids: Dr. Jekyll and Mr. Hyde of Hippocampal Neuroinflammation // *Biochemistry (Mosc)*. 2021. Vol. 86, N 2. P. 156–167. doi: 10.1134/S0006297921020048
- Nissen R.M., Yamamoto K.R. The glucocorticoid receptor inhibits NF κ B by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain // *Genes Dev*. 2000. Vol. 14, N 18. P. 2314–2329. doi: 10.1101/gad.827900
- Herculano-Houzel S., Watson C., Paxinos G. Distribution of neurons in functional areas of the mouse cerebral cortex reveals quantitatively different cortical zones // *Front Neuroanat*. 2013. Vol. 7. P. 35. doi: 10.3389/fnana.2013.00035
- Chai Z., Alheim K., Lundkvist J., et al. Subchronic glucocorticoid pretreatment reversibly attenuates IL-1 β induced fever in rats; IL-6 mRNA is elevated while IL-1 α and IL-1 β mRNAs are suppressed, in the CNS // *Cytokine*. 1996. Vol. 8, N 3. P. 227–237. doi: 10.1006/cyto.1996.0032
- Frank M.G., Hershman S.A., Weber M.D., et al. Chronic exposure to exogenous glucocorticoids primes microglia to pro-inflammatory stimuli and induces NLRP3 mRNA in the hippocampus // *Psychoneuroendocrinology*. 2014. Vol. 40. P. 191–200. doi: 10.1016/j.psyneuen.2013.11.006
- Espinosa-Oliva A.M., de Pablos R.M., Villarán R.F., et al. Stress is critical for LPS-induced activation of microglia and damage in the rat hippocampus // *Neurobiol Aging*. 2011. Vol. 32, N 1. P. 85–102. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.01.012

References

- De Keyser J., Zwanikken CM, Zorgdrager A, et al. Treatment of acute relapses in multiple sclerosis at home with oral dexamethasone: a pilot study. *J Clin Neurosci*. 1999;6(5):382–384. doi: 10.1054/jocn.1997.0086
- Bolshakov AP, Tret'yakova LV, Kvichansky AA, Gulyaeva NV. Glucocorticoids: Dr. Jekyll and Mr. Hyde of Hippocampal Neuroinflammation. *Biochemistry (Mosc)*. 2021;86(2):156–167. doi: 10.1134/S0006297921020048
- Nissen RM, Yamamoto KR. The glucocorticoid receptor inhibits NF κ B by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev*. 2000;14(18):2314–2329. doi: 10.1101/gad.827900
- Herculano-Houzel S, Watson C, Paxinos G. Distribution of neurons in functional areas of the mouse cerebral cortex reveals quantitatively different cortical zones. *Front Neuroanat*. 2013;7:35. doi: 10.3389/fnana.2013.00035
- Chai Z, Alheim K, Lundkvist J, et al. Subchronic glucocorticoid pretreatment reversibly attenuates IL-1 β induced fever in rats; IL-6 mRNA is elevated while IL-1 α and IL-1 β mRNAs are suppressed, in the CNS. *Cytokine*. 1996;8(3):227–237. doi: 10.1006/cyto.1996.0032
- Frank MG, Hershman SA, Weber MD, et al. Chronic exposure to exogenous glucocorticoids primes microglia to pro-inflammatory stimuli and induces NLRP3 mRNA in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology*. 2014;40:191–200. doi: 10.1016/j.psyneuen.2013.11.006
- Espinosa-Oliva AM, de Pablos RM, Villarán RF, et al. Stress is critical for LPS-induced activation of microglia and damage in the rat hippocampus. *Neurobiol Aging*. 2011;32(1):85–102. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.01.012

Информация об авторах / Information about the authors

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

Татьяна Валентиновна Тютюнник — аспирант.

ORCID: 0000-0002-2427-9355;

eLibrary SPIN: 5440-6221;

e-mail: t.tanjon11@yandex.ru

Валентина Михайловна Кудринская — лаборант-исследователь.

ORCID: 0000-0002-2763-5191;

eLibrary SPIN: 4150-3364;

e-mail: v.kudrinskaja2011@yandex.ru

Дарья Алексеевна Обухова — лаборант-исследователь.

ORCID: 0009-0002-4287-0808;

eLibrary SPIN: 3164-3927;

e-mail: obuhowadaria@gmail.com

Виктория Александровна Майстренко — младший научный сотрудник.

ORCID: 0000-0001-7004-7873;

e-mail: sch_viktoria@mail.ru

Нина Сергеевна Пестерева — старший научный сотрудник.

ORCID: 0000-0002-3104-8790;

eLibrary SPIN: 1088-6479;

e-mail: Pesterevans@yandex.ru

Tatiana V. Tiutiunnik — postgraduate student.

ORCID: 0000-0002-2427-9355;

eLibrary SPIN: 5440-6221;

e-mail: t.tanjon11@yandex.ru

Valentina M. Kudrinskaya — research assistant.

ORCID: 0000-0002-2763-5191;

eLibrary SPIN: 4150-3364;

e-mail: v.kudrinskaja2011@yandex.ru

Daria A. Obukhova — research assistant.

ORCID: 0009-0002-4287-0808;

eLibrary SPIN: 3164-3927;

e-mail: obuhowadaria@gmail.com

Viktoriya A. Maystrenko — Junior Research Associate.

ORCID: 0000-0001-7004-7873;

e-mail: sch_viktoria@mail.ru

Nina S. Pestereva —

Senior Research Associate.

ORCID: 0000-0002-3104-8790;

eLibrary SPIN: 1088-6479;

e-mail: Pesterevans@yandex.ru

✉ Контактное лицо / Corresponding author

Татьяна Валентиновна Тютюнник / Tatiana V. Tiutiunnik

Адрес: Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12

Address: 12 Academician Pavlov St., Saint Petersburg, 197022, Russia

E-mail: t.tanjon11@yandex.ru