

ОСОБЕННОСТИ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА У ПАЦИЕНТОК С ВПЧ-АССОЦИИРОВАННОЙ ЭКТОПИЕЙ ШЕЙКИ МАТКИ

© 2018 г. М. А. Зотова¹, К. В. Никушкина¹, Е. А. Мезенцева¹,
И. Л. Батурина¹, Ю. В. Логинова¹, И. В. Самусева¹, Т. Г. Смирнова¹,
Т. И. Никонова¹, К. Г. Громакова^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства
Здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия;

²ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия

Поступила: 11.05.2018. Принята: 13.06.2018

Работа посвящена оценке роли факторов врожденного иммунитета при эктопии шейки матки, ассоциированной с папилломавирусной инфекцией. Всем женщинам проводили определение вирусной нагрузки и генотипирование вируса папилломы человека (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типы) методом ПЦР в режиме реального времени. Проведено изучение цитокинового профиля (ИЛ 1 β , РАИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-8, ИЛ-10, ФНО- α , ИФ- α , ИФ- γ) и нейтрофильного звена иммунитета цервикальной слизи у женщин с эктопией шейки матки, ассоциированной с вирусом папилломы человека онкогенного риска. По результатам исследования выявлен широкий спектр онкогенных типов вируса папилломы человека, среди которых лидировал высокоагрессивный 16 тип. В 28,95% случаев определено инфицирование несколькими типами вируса, а в 74,93% случаев — значимая и повышенная вирусная нагрузка. Изменения функциональной способности нейтрофилов цервикальной слизи заключались в достоверном снижении фагоцитарной реакции, кислородзависимого метаболизма, выраженном в угнетении активности и интенсивности спонтанного и индуцированного НСТ-тестов по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы.

Ключевые слова: вирус папилломы человека, эктопия шейки матки, цитокины, нейтрофилы, вирусная нагрузка

DOI: 10.31857/S102872210002401-6

Адрес: 454091, Челябинск, ул. Воровского, д. 64а. НИИ иммунологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Зотова Мария Александровна;
Тел.: +79090723055, E-mail: zotova.chel@mail.ru.

Авторы:

Зотова М. А., к.б.н., научный сотрудник НИИ иммунологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

Никушкина К. В., к.м.н., в.н.с. НИИ иммунологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

Мезенцева Е. А., к.м.н., с.н.с. НИИ иммунологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

Батурина И. Л., к.м.н., с.н.с. НИИ иммунологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

Логинова Ю. В., м.н.с. НИИ иммунологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

Никонова Т. И., старший лаборант НИИ иммунологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

Смирнова Т. Г., к.б.н., м.н.с. НИИ иммунологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

Громакова К. Г., старший лаборант НИИ иммунологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, магистрант биологического факультета ФГБОУ ВО ЧелГУ, Челябинск, Россияю

ВВЕДЕНИЕ

Эктопия шейки матки является распространенным видом гинекологической патологии, встречаемость которой составляет до 49,2% всех патологических процессов шейки матки [1]. Изменения цервикального эпителия при эктопии снижают физиологическую защиту шейки матки, делая ее более уязвимой для инфекционных агентов. Поэтому довольно часто эктопии регистрируются в виде осложненных форм в сочетании с инфекциями, передаваемыми половым путем (ИППП). На сегодняшний день

одной из наиболее распространенных ИППП вирусной этиологии является папилломавирусная инфекция (ПВИ). Инфицированность вирусом папилломы человека (ВПЧ) приобретает особую значимость, поскольку персистенция его онкогенных типов может привести к неопластической прогрессии. В настоящее время в качестве факторов, имеющих прямое или опосредованное отношение к персистенции ВПЧ и реализации его онкогенного потенциала, рассматриваются инфекция, вызванная онкогенными типами ВПЧ, несколькими типами одновременно и высокая вирусная нагрузка. Однако длительная персистенция вируса, его спонтанное регрессирование и низкий уровень неопластической прогрессии дает возможность предположить, что ВПЧ является необходимым, но не достаточным фактором в мультистадийном процессе канцерогенеза [2]. Немаловажную роль в прогрессировании заболевания играют эндогенные факторы, среди которых, наряду с нарушением гормонального гомеостаза, связанного с функцией гениталий, большое значение имеют изменения состояния иммунологического статуса. Основной мишенью ВПЧ являются способные к митозу резервные клетки базального слоя слизистой оболочки цервикального канала настолько чувствительные к инфекции, что достаточно единичных вирусных частиц для развития инфекционного процесса. Заражение клеток базального слоя эпителия вирионами ВПЧ происходит через микротрещины и через линии стыка цилиндрического и многослойного эпителия шейки матки [3]. Проникновению вирусов в клетки способствуют изменения влагалищной среды и аномальное состояние поверхностных слоев эпителия при эктопии шейки матки, которая может послужит стартовой площадкой для злокачественной трансформации под воздействием различных экзогенных и эндогенных факторов. В связи с этим, существенное значение имеет состояние местного иммунитета цервикального канала [4], а именно компонентов врожденного иммунитета, важными функциональными элементами которого являются нейтрофилы. Большой интерес к изучению состояния нейтрофилов цервикальной слизи обусловлен тем, что они являются основными иммуноэффекторными клетками, осуществляющими первую встречу с патогеном. Нейтрофил может оказывать свое воздействие на антиген, вызвавший его активацию, либо с помощью фагоцитоза, либо путем секреции биологиче-

ски активных веществ, которые образуются в процессе созревания клеток и присутствуют в их гранулах, а также синтезируются вновь после активации [5, 6]. С помощью этих веществ нейтрофил может осуществлять внеклеточный киллинг, а также вступать в медиаторные контакты с гуморальными системами и клетками крови, клетками эндотелия и соединительной ткани, оказывая тем самым свое регуляторное действие [7]. Активированный нейтрофил секретирует наряду с продуктами гранул широкий спектр цитокинов и таким образом не только влияет на активность других иммунокомпетентных клеток, но и регулирует иммунный ответ [8, 9, 10]. На местном уровне цитокины контролируют все последовательные этапы развития воспаления и адекватность ответа на внедрение патогена, обеспечение его локализации и удаления, а в последующем – репарации поврежденной ткани [11].

Учитывая вышеизложенное, перспективным направлением для оценки роли факторов врожденного иммунитета при эктопии шейки матки, ассоциированной с ПВИ, является исследование цитокинового профиля и функциональной активности нейтрофилов цервикальной слизи, что и явилось **целью** нашего исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено изучение иммунологических показателей цервикальной слизи у 58 женщин, из которых 38 женщин с диагнозом эктопия шейки матки, ассоциированная с ПВИ. Диагноз был выставлен акушерами-гинекологами женской консультации МУЗ ГKB № 8 г. Челябинска на основании анамнестических, клинических, кольпоскопических, гистологических и молекулярно-биологических методов исследования. Группу контроля составили 20 практически здоровых женщин (без наличия ВПЧ в цервикальном канале и не имеющих клинических, цитологических и кольпоскопических изменений на шейке матки).

Материалом для выделения ДНК ВПЧ и последующей амплификации послужили соскобы эпителия цервикального канала, взятые одноразовыми цитощетками до начала курса лечения в 1 фазу менструального цикла. В качестве метода выявления, дифференциации и количественного определения ДНК ВПЧ высокого риска использовалась ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с использованием диагностических

наборов «Амплисенс ВПЧ ВКР – СКРИН-ТИТР FRT» и «Амплисенс ВПЧ ВКР – ГЕНОТИП FRT» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, г. Москва. Анализ данных осуществлялся автоматически, с помощью программы «AmpliSens FRT HR HPV Screen Quant Results Matrix.xls». Результаты концентрации ДНК ВПЧ выражались в lg (ВПЧ на 100 тыс. клеток). Порог клинической значимости принимается равным 3 логарифма геномов ВПЧ на 100 тыс. клеток человека, а порог прогрессии – 5 логарифмов ВПЧ на 100 тыс. клеток. Результаты трактовались следующим образом: менее 3 lg – малозначимая, от 3 до 5 lg – значимая и более 5 lg – повышенная вирусная нагрузка. ПЦР исследования проводились на четырехканальном амплификаторе «Rotor-Gene» 6000 (Corbett Research, Австралия).

Для оценки иммунологических показателей исследовалась цервикальная слизь, в которой определяли общее количество лейкоцитов, абсолютное и относительное содержание жизнеспособных клеток в 1 мл секрета, функциональную активность нейтрофилов – фагоцитарную и лизосомальную активности, кислородзависимый метаболизм и функциональный резерв нейтрофилов в НСТ-тесте. С помощью твердофазного ИФА определяли концентрацию уровней цитокинов (ИЛ 1 β , РАИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-8, ИЛ-10, ФНО- α , ИФН- α , ИФН- γ) в цервикальной слизи (на соответствующих тест-системах ООО «Цитокин» (г. Санкт-Петербург)).

Полученные результаты исследования обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6.0». При анализе количественных признаков оценка достоверности различий между группами производилась с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Средний возраст пациенток контрольной группы составил $33,29 \pm 0,62$ лет, несколько моложе были пациентки с эктопией шейки матки (средний возраст $27,28 \pm 0,41$ лет).

Генотипирование ВПЧ показало, что у женщин исследуемой группы в 71,05% случаев обнаруживался один тип, в 28,95% – сочетание двух и более типов ВПЧ высокого риска. Наиболее часто выявляемым был 16 тип – 21,74%, второе место занимал 31 тип (15,94%), третье место 51 тип – 13,04%. 56 тип ВПЧ обнаруживался в 11,6% случаях. С одинаковой частотой встречаемости (5,8%) выявлены ВПЧ 33, 35, 39 и 45 типов. Реже в данной группе встречались 18 и 59 (в 4,35% каждый), и 52 (2,9%) и 58 (2,9%) типы ВПЧ высокого риска.

Оценка вирусной нагрузки в исследуемой группе показала, что малозначимая ($< 3 \lg$ ВПЧ/10⁵) обнаружена в 25% случаев, значимая

Таблица 1. Результаты иммунологического обследования цервикальной слизи

Показатель	Группа контроля (n=20)	Эктопия шейки матки, ассоциированная с ПВИ, (n=38)
Общее количество лейкоцитов, $\times 10^9$ /л	$7,83 \pm 1,16$	$19,39 \pm 3,46^*$
Относительное содержание жизнеспособных клеток, %	$46,10 \pm 3,43$	$29,78 \pm 3,74^*$
Абсолютное содержание жизнеспособных клеток, у.е.	$3,26 \pm 0,43$	$5,09 \pm 1,07$
Активность фагоцитоза нейтрофилов, %	$64,60 \pm 2,16$	$50,00 \pm 3,42^*$
Интенсивность фагоцитоза нейтрофилов, у.е.	$2,76 \pm 0,19$	$1,29 \pm 0,15^*$
Фагоцитарное число, у.е.	$4,19 \pm 0,25$	$2,49 \pm 0,16^*$
Активность спонтанного НСТ, %	$24,20 \pm 2,06$	$13,44 \pm 1,22^*$
Интенсивность спонтанного НСТ, у.е.	$0,31 \pm 0,03$	$0,18 \pm 0,02^*$
Активность индуцированного НСТ, %	$45,00 \pm 2,96$	$29,89 \pm 2,62^*$
Интенсивность индуцированного НСТ, у.е.	$0,60 \pm 0,04$	$0,35 \pm 0,04^*$
Функциональный резерв нейтрофилов, у.е.	$2,08 \pm 0,12$	$2,38 \pm 0,38$
Лизосомальная активность, %	$106,67 \pm 24,46$	$123,43 \pm 37,80$

Примечание: * – достоверные отличия показателей от группы контроля ($p < 0,05$); n – число обследованных женщин.

Таблица 2. Содержание цитокинов в цервикальной слизи у обследованных женщин

Показатель	Группа контроля (n=20)	Эктопия шейки матки, ассоциированная с ПВИ (n=38)
ИЛ-1 β (пг/мл)	1385,20 \pm 396,93	535,63 \pm 148,60
РАИЛ-1 (пг/мл)	10934,16 \pm 3380,98	5610,17 \pm 1066,40
ИЛ-2 (пг/мл)	59,92 \pm 4,69	118,19 \pm 17,52*
ИЛ-4 (пг/мл)	86,26 \pm 86,26	198,89 \pm 54,56
ИЛ-8 (пг/мл)	2373,88 \pm 672,22	1061,01 \pm 302,97
ИЛ-10 (пг/мл)	67,72 \pm 5,88	79,97 \pm 4,40
ФНО- α (пг/мл)	150,86 \pm 39,84	124,28 \pm 39,80
ИФН- α (пг/мл)	192,21 \pm 36,55	1631,75 \pm 311,71*
ИФН- γ (пг/мл)	258,33 \pm 38,79	431,85 \pm 63,94

Примечание: * – достоверные отличия показателей от группы контроля ($p \leq 0,05$); n – число обследованных женщин.

(3–5 lg ВПЧ/10⁵) в 28,57% и повышенная (>5 lg ВПЧ/10⁵) в 46,43%.

Характеристика клеточного состава и функционального состояния нейтрофилов цервикальной слизи представлены в **таблице 1**.

Из приведенных данных видно, что у женщин с эктопией шейки матки, ассоциированной с ПВИ, общее число лейкоцитов цервикальной слизи было достоверно повышено, в то же время отмечалось достоверное снижение процентного содержания жизнеспособных клеток относительно контрольных показателей.

Функциональная активность нейтрофилов цервикальной слизи исследуемой группы характеризовалась достоверным снижением активности, интенсивности фагоцитоза и фагоцитарного числа, активности и интенсивности спонтанного и индуцированного НСТ-тестов по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы. При этом функциональный резерв нейтрофилов сохранялся на уровне контроля.

Достоверных отличий лизосомальной активности нейтрофилов цервикальной слизи в изучаемых группах выявлено не было.

Среди изучаемых показателей цитокинового профиля цервикальной слизи достоверно изменялись только ИЛ-2 и ИФН- α , реагируя увеличением в группе с эктопией шейки матки, ассоциированной с ПВИ, по сравнению с контрольной группой (**табл. 2**).

ОБСУЖДЕНИЕ

У пациенток с эктопией шейки матки, ассоциированной с папилломавирусной инфекцией, выявлен широкий спектр онкогенных типов

ВПЧ, среди которых лидирующую позицию занимает высокоагрессивный 16 тип вируса. При этом в 28,95% случаев установлена микстинфекция несколькими типами ВПЧ высокого риска, а в 74,93% случаев – значимая и повышенная вирусная нагрузка. Наличие этих вирусологических факторов, способствующих персистенции и реализации онкогенного потенциала ВПЧ высокого риска будут вносить свой вклад в дальнейший исход патологического процесса.

Выявленные нами изменения функциональных способностей нейтрофилов цервикальной слизи у женщин с эктопией шейки матки, ассоциированной с ПВИ, выражались в достоверным снижением фагоцитарной реакции, кислородзависимого метаболизма, выраженном в угнетении активности и интенсивности спонтанного и индуцированного НСТ-тестов по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы. Это свидетельствует о несостоятельности нейтрофильного звена врожденного иммунитета при папилломавирусной инфекции и может способствовать хронизации заболевания. В то же время, повышенное содержание ИЛ-2, свидетельствующее об активации Т-хелперов I типа, и увеличение ИФН- α , оказывающего противовирусное действие, может способствовать элиминации ВПЧ со слизистых оболочек половых путей за счет активации специфического иммунного ответа.

ВЫВОДЫ

Полученные данные отражают локальный дисбаланс иммунной защиты при эктопии шейки матки, ассоциированной с ПВИ, и свиде-

тельствуют о необходимости дальнейшего многостороннего изучения состояния иммунной системы при данной патологии, а также динамического наблюдения за такими пациентками с обязательным определением 12 онкогенных типов ВПЧ, их вирусной нагрузки для своевременного формирования групп повышенного риска развития неопластических процессов шейки матки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Русакевич П. С., Фокина П. С.* Эктопии шейки матки (современное состояние проблемы). Охрана материнства и детства 2006, 1–7, 88–93. [*Rusakevich P.S., Fokina P.S.* Ectopias of the cervix (current state of the problem). Protection of motherhood and childhood 2006, 1–7, 88–93].
2. *Олина А. А., Падруль В. М.* Местный иммунитет и локальная иммунотерапия эктопии шейки матки. Журнал акушерства и женских болезней 2006, LV(4), 71–76. [*Olina A.A., Padrul V.M.* Local immunity and local immunotherapy of cervical ectopy. Journal of Obstetrics and Women's Diseases 2006, LV, 4, 71–76].
3. *Маньинбаев О. А., Елисеева М. Ю., Доорбар Дж., Манухин И. Б.* Эпидемиология, молекулярная биология, патофизиология и принципы иммунотерапии ПВИ. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии 2009, 8, 3, 69–79. [*Mannybaev O.A., Eliseeva M. Yu., Doorbar J., Manukhin I.B.* Epidemiology, molecular biology, pathophysiology and principles of immunotherapy of PVI. Questions of gynecology, obstetrics and perinatology 2009, 8 (3), 69–79].
4. *Привалова М. А.* Изменения местного иммунитета при воспалительных заболеваниях женских половых органов. Вестник новых медицинских технологий 2008, XV(2), 55–56. [*Privalova M.A.* Changes in local immunity in inflammatory diseases of female genital organs. Bulletin of New Medical Technologies 2008, XV(2), 55–56.]
5. *Долгушин И. И., Бухарин О. В.* Нейтрофилы и гомеостаз. В кн.: Нейтрофилы и гомеостаз. УрО РАН, Екатеринбург 2001, 282 с. [*Dolgushin I.I., Bukharin O.V.* Neutrophils and homeostasis. In the book.: Neutrophils and homeostasis. Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg 2001, 282 p.]
6. *Zhang X., Kluger Y., Nakayama Y.* Gene expression in mature neutrophils: early responses to inflammatory stimuli. J. Leukoc. Biol. 2004, Vol.75, № 2, 358–372.
7. *Долгушин И. И., Андреева Ю. С., Савочкина А. Ю.* Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. Издательство РАМН, Москва 2009, 208с. [*Dolgushin I.I., Andreeva Yu.S., Savochkina A. Yu.* Neutrophil extracellular traps and methods for assessing the functional status of neutrophils. Publishing house of RAMS, Moscow 2009, 208 p.]
8. *Нестерова И. В.* Физиологическая роль нейтрофильных гранулоцитов в поддержании иммунного гомеостаза. Росс. иммун. Журнал 2004, 9, Приложение 1, 17. [*Nesterova I.V.* The physiological role of neutrophilic granulocytes in the maintenance of immune homeostasis. Ross. immun. Journal 2004, 9, Appendix 1, 17].
9. *Швыдченко И. Н., Нестерова И. В., Синельникова Е. Ю.* Цитокинсекретирующая функция нейтрофильных гранулоцитов. Иммунология 2005, 1, 31–34. [*Shvydchenko I.N., Nesterova I.V., Sinelnikova E. Yu.* Cytokine secreting function of neutrophilic granulocytes. Immunology 2005, 1, 31–34].
10. *Denkers E. Y., Del Rio L., Bennouna S.* Neutrophil production of IL-12 and other cytokines during microbial infection. Chem.Immunol. Allergy 2003, 83, 95–114.
11. *Симбирцев А. С.* Цитокины – новая система регуляции защитных реакций организма. Цитокины и воспаление 2002, 1, 125–126. [*Simbirtsev A.S.* Cytokines are a new system of regulation of the body's defense responses. Cytokines and inflammation 2002, 1, 125–126].

FEATURES OF THE INFECTIOUS PROCESS IN PATIENTS WITH HPV-ASSOCIATED ECTOPIA OF THE CERVIX UTERI

© 2018 M. A. Zotova¹, K. V. Nikushkina¹, E. A. Mezentseva¹, I. L. Baturina¹, Y. V. Loginova¹, I. V. Samuseva¹, T. G. Smirnova¹, T. I. Nikonova¹, K. G. Gromakova^{1,2}

¹FSBEI of Higher Education "South-Ural State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

²FSBEI of Higher Education "Chelyabinsk State University", Chelyabinsk, Russia

Received: 11.05.2018. Accepted: 13.06.2018

The work is devoted to the evaluation of the role of factors of innate immunity in cervical ectopy associated with papillomavirus infection. All women underwent viral load determination and genotyping of human papillomavirus (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 types) by real-time PCR. The study of the cytokine profile (IL 1 β , RAIL-1, IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, TNF- α , IF- α , IF- γ) and neutrophilic immunity of cervical mucus in women with ectopia of the cervix, associated with the human papillomavirus of oncogenic risk. According to the results of the study, a wide spectrum of oncogenic types of human papillomavirus was identified, among which the highly aggressive type 16 was the leader. In 28.95% of cases, infection was detected by several types of the virus, and in 74.93% of cases, significant and increased viral load was detected. Changes in the functional capacity of neutrophils of cervical mucus consisted in a significant decrease in phagocytic reaction, oxygen-dependent metabolism, expressed in inhibition of activity and intensity of spontaneous and induced NST-tests in comparison with similar parameters of the control group.

Key words: human papilloma virus, cervical ectopia, cytokines, neutrophils, viral load

Authors:

M. A. Zotova, ✉ Candidate of Biological Sciences, Research Officer, Research Institute of Immunology FSBEI HE SUSMU MOH Russia, Chelyabinsk, Russia;

454091, Chelyabinsk, Vorovskogo str., 64a, Research Institute of Immunology FSBEI HE SUSMU MOH Russia. Phone: +79090723055, E-mail: zotova.chel@mail.ru;

K. V. Nikhushkina, Candidate of Medical Sciences, Leading Researcher, Research Institute of Immunology FSBEI HE SUSMU MOH Russia, Chelyabinsk, Russia;

E. A. Mezenceva, Candidate of Medical Sciences, Senior Research Officer, Research Institute of Immunology FSBEI HE SUSMU MOH Russia, Chelyabinsk, Russia;

I. L. Barurina, Candidate of Medical Sciences, Senior Research Officer, Research Institute of Immunology FSBEI HE SUSMU MOH Russia, Chelyabinsk, Russia;

Y. V. Loginova, Candidate of Medical Sciences, Research Assistant, Research Institute of Immunology FSBEI HE SUSMU MOH Russia, Chelyabinsk, Russia;

T. I. Nikonova, senior Assistant, Research Institute of Immunology FSBEI HE SUSMU MOH Russia, Chelyabinsk, Russia;

T. G. Smirnova, Candidate of Biological Sciences, Research Assistant, Research Institute of Immunology FSBEI HE SUSMU MOH Russia, Chelyabinsk, Russia;

K. G. Gromakova, Senior Assistant, Research Institute of Immunology FSBEI HE SUSMU MOH Russia, graduate student Faculty of Biology Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia.