

Влияние метиленовой сини на подвижность сперматозоидов человека *in vitro*

В.В. Евдокимов¹, Н.К. Исаев², В.Б. Туровецкий², С.К. Пирутин²

¹ НИИ урологии и интервенционной радиологии им.Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 105425, Россия, 3-я Парковая ул., д. 51, стр. 4

² МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы МГУ 1, стр. 73

Ответственный за контакт с редакцией: Евдокимов Валерий Васильевич, vvevdok@mail.ru

Введение. Современная демографическая ситуация в Российской Федерации характеризуется падением рождаемости. По данным Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова число бесплодных браков в стране выше 17%. Более 4 млн мужчин страдают бесплодием различной формы. Нарушения репродуктивной функции приобретают в этой связи медико-социальное значение. Однако коррекция нарушений не имеет должного эффекта. Поэтому актуальной проблемой андрологии и репродукции является поиск препаратов, влияющих на сохранение фертильности. Целью проведенной работы было исследование влияния препарата метиленовой сини (МС) на подвижность и жизнеспособность сперматозоидов.

Материалы и методы. Исследование проводили на сперматозоидах человека из эякулята, полученного общепринятым способом. Параметры подвижности и жизнеспособности оценивали по рекомендации ВОЗ 5-го издания. Из полученного образца эякулята отбирали по 1 мл для опыта и контроля. В опытную пробирку вносили препарат МС до конечной концентрации 1 нМ. Полученные результаты представлены в виде средних арифметических и их среднеквадратических ошибок. Различия параметров обрабатывали с использованием критерия Стьюдента, достоверными считали при $p < 0,05$.

Результаты. Эксперименты с препаратом проводили в двух группах, сформированных по уровню исходной подвижности: астенозооспермия и нормозооспермия. Использовано в каждой группе 13 эякулятов. Оценивали подвижность по фракциям активной, малой и общей подвижности на протяжении 2-х часов. В группе астенозооспермии значительно повысилась на 72% активная подвижность в первые 30 мин эксперимента и к концу опыта возвратилась к исходному уровню. Малая и общая подвижность на протяжении опыта имела тенденцию к снижению уровня на 20-30%. В группе нормозооспермии активная подвижность повысилась на 89% и 35% в течение 30-60 мин эксперимента. Малая и общая подвижность существенно не изменялась в этот период. Число живых форм сперматозоидов на протяжении опыта в обеих группах не изменилось.

Обсуждение. Исследование воздействия препарата МС на сперматозоиды показало выраженный эффект на подвижность клеток. Механизм стимулирующего действия препарата окончательно не решен, однако в литературе имеются указания о влиянии метиленовой сини на кальциевый гомеостаз и на функциональную активность митохондрий. Кроме того, известно о влиянии на подвижность сперматозоидов и активности фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа.

Выводы. Препарат МС имеет перспективу использования в практике вспомогательных репродуктивных технологий.

Ключевые слова: сперматозоиды, подвижность, метиленовая синь.

Для цитирования: Евдокимов В.В., Исаев Н.К., Туровецкий В.Б., Пирутин С.К. Влияние метиленовой сини на подвижность сперматозоидов человека *in vitro*. Экспериментальная и клиническая урология 2019;(3):50-53

DOI: 10.29188/2222-8543-2019-11-3-50-53

Influence of methylene blue on human spermatozoid mobility *in vitro* V.V. Evdokimov, N.K. Isaev, V.B. Turovetsky, S.K. Pirutin

¹ N. Lopatkin Research Institute of Urology and Interventional Radiology named after a - branch of the Federal State Budgetary Institution Scientific Research Center for Radiology of the Ministry of Health of Russia, 105425, Russia, 3-rd Parkovaya st., 51, build 4

² Moscow State University M.V. Lomonosov, Faculty of Biology, 119991 г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы МГУ 1, стр. 73

Contacts: Evdokimov Valery Vasilievich, vvevdok@mail.ru

Introduction. Contemporary demographic situation in Russian Federation is characterized by low birth rates. According to data provided by V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology the percentage of infertile couples in our country is over 17%. Reproductive dysfunction therefore becomes medically and socially important. However, treatment of this dysfunction has inadequate efficacy. Search for medications which may help conserve fertility is a relevant problem of andrology and reproduction. The goal of this study was to evaluate the effect of methylene blue (MB) preparation on sperm motility and viability.

Materials and methods. The study was performed on ejaculated human sperm obtained by usual means. Motility and viability parameters were evaluated according to 5th edition of WHO guidelines. One milliliter was taken from every semen sample for experiment and control. MB was introduced to experimental sample tube until 1 nM concentration was obtained. The results are presented as arithmetic means and mean square errors. Differences between parameters were assessed by Student test and considered to be significant with $p < 0,05$.

Results. Experiments were performed in two groups which were initially formed according to motility: asthenozoospermic and normozoospermic. Thirteen semen samples were tested in each group. Motility was evaluated by percentages of active, sluggish and total motility during 2 hours. Active motility in asthenozoospermic group significantly increased by 72% during the first 30 minutes of experiment, and then dropped to baseline level. Sluggish and total motility tended to drop by 20-30% during the experiment. In normozoospermic group active motility increased by 89% and 35% during the first 30-60 minutes of experiment. Sluggish and total motility didn't change significantly during this period. Number of viable sperm didn't change during the experiment in both groups.

Discussion. Assessment of MB influence on sperm demonstrated its significant effect regarding sperm motility. Mechanism behind this stimulating action is not completely understood, but it is stated in the literature that methylene blue affects calcium homeostasis and functional activity of mitochondria. Also, it is known that it may influence sperm motility and enzymatic activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Conclusion. MB preparations are promising agents to be used in assisted reproductive technologies.

Key words: sperm, motility, methylene blue.

For citation: Evdokimov V.V., Isaev N.K., Turovetsky V.B., Pirutin S.K. Influence of methylene blue on human spermatozoid mobility *in vitro*. Experimental and clinical urology 2019;(3):50-53

В настоящее время демографическая ситуация в стране характеризуется падением рождаемости. Эта тенденция по оценкам демографов сохранится на протяжении нескольких лет. По данным ВОЗ процент бесплодного брака в разных странах достигает 10-15% от общего числа супружеских пар. В Российской Федерации по данным Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова это число составляет 17%, а у более 4 млн мужчин диагностировано бесплодие различной формы [1-3].

В последние годы нарушения репродуктивной функции у мужчин имеют особую медицинскую и социальную значимость в связи с прогрессирующим снижением фертильных свойств сперматозоидов [4,5]. Нарушения фертильности рассматривают как многофакторное состояние, которое может быть опосредовано наличием патологических изменений в органах половой системы (варикоцеле, простатит, инфекции, передающиеся половым путем, крипторхизм, гипогонадизм и др.), а также влиянием внешних факторов (курение, алкоголь, гиподинамия, ожирение, электро-магнитное излучение различных источников, неблагоприятные экологические факторы, проф-вредности) [6]. Эти воздействия могут влиять одновременно, усиливая изменения репродуктивной функции, и вызывать нарушения гормонального профиля. По всей вероятности, совокупность этих факторов приводит к высокому проценту идиопатической формы бесплодия, достигающему до 30-50% в структуре мужского бесплодия, что вызывает не только сложность диагностики, но и выбор лечебной тактики выявленных нарушений [7].

До настоящего времени лечение и диагностика мужского бесплодия остаются малоэффективными, коррекция нарушений мужской фертильности не всегда приводят к положительным результатам. В этом случае для нормализации структурно-функционального состояния мужских половых клеток используют гормональные препараты, витамины, микроэлементы, антиоксиданты и др. Однако эффект такого лечения не всегда удовлетворяет и пациента и врача. Поэтому одной из актуальных задач современной андрологии является поиск агентов, способных повышать подвижность сперматозоидов, а также увеличивать их устойчивость к воздействию повреждающих факторов различной природы.

Ранее нами был выполнен ряд экспериментов, направленных на поиск способов повышения мужской фертильности путем увеличения подвижности сперматозоидов при помощи регуляторных пептидов [8] или белково-пептидный комплекса (БПК), полученного из семенников быка. [9]. Исследования показали, что регуляторные пептиды и препараты БПК обладали ярко выраженной способностью увеличивать как активную, так и общую подвижность сперматозоидов.

В последствии, проведенный анализ литературы указал на возможность использования метиленовой

сини (МС) в качестве агента, влияющего функциональную активность сперматозоидов [10,11]. Мы предположили, что увеличить подвижность сперматозоидов можно с помощью веществ, которые непосредственно способны влиять на функционирование митохондрий, одним из таких агентов является метиленовый синий. В ряде работ отмечен позитивный эффект воздействия метиленового синего, где развитие клеточного повреждения связано с нарушением митохондриальных функций [12]. В настоящее время МС используется в медицине в качестве антисептика и для лечения метгемоглобинемии, вазоплегического синдрома и фосфамидной нейротоксичности. Более того, на моделях инсульта, болезни Альцгеймера и Паркинсона показаны нейропротекторные свойства МС [13, 14]. Авторы связывают защитный эффект с тем, что МС усиливает аутофагию, снижает отек головного мозга, а также ингибирует активацию микроглии и уменьшает воспаление. Следует отметить, что химически это вещество является трициклическим фенотиазином [15] и в митохондриях может исполнять роль катализатора окислительно-восстановительного цикла.

М. Oz и соавт. продемонстрировали эффект действия МС в эксперименте. Ими было показано, что этот препарат способен снижать нарушения органных функций крыс, вызванных воздействием ряда повреждающих факторов. В экспериментах *in vitro* показано, что МС эффективно снижает гибель культивированных нейронов, вызванную паракватом или ионами цинка, токсическое действие которых направлено на митохондрии [14].

В связи с вышеизложенным, задачей данной работы является исследование биологического действия препарата метиленовой сини на подвижность и жизнеспособность сперматозоидов человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на сперматозоидах человека из эякулята, полученного общепринятым способом. После разжижения через 40-60 мин эякулят микроскопировали в проходящем свете при увеличении $\times 400$ на микроскопе Amplival (Karl Zeiss, Iena). Оценку подвижности сперматозоидов и другие параметры эякулята осуществляли по стандарту ВОЗ 5-го издания [16]. Эксперименты проводили при температуре 20–22°C. Из полученного образца эякулята отбирали по 1 мл для опыта и контроля. В опытную пробирку вносили препарат МС до конечной концентрации 1 нМ.

Полученные результаты представлены в виде средних арифметических значений исследованных параметров и их среднеквадратических ошибок. Результаты экспериментов обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента. Различия между средними арифметическими значениями параметров считали достоверными при $p < 0,05$. ■

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мы провели ряд экспериментов с подвижными клетками – сперматозоидами. В одной серии опытов использовали эякулят (13 пациентов) с исходной низкой подвижностью сперматозоидов (табл. 1). В другой серии были использованы образцы эякулята (10 пациентов) с исходной нормальной подвижностью сперматозоидов (табл. 2). Подвижность сперматозоидов (общая, активная и малая) рассчитывалась как содержание в эякуляте подвижных клеток на 100 проанализированных. Общая подвижность – сумма фракций активной и малой подвижности. В таблицах скобках даны результаты относительно исходного уровня, принятого за относительные 100%.

При исходной астенозооспермии (табл. 1) активная подвижность значительно выросла в первые 30 мин опыта, затем снизилась до исходного уровня. Малая подвижность через 2 часа наблюдения заметно снижалась, общая подвижность также после некоторого повышения упала до исходного уровня.

При нормозооспермии (табл. 2) активная подвижность существенно изменялась на протяжении 2 часов наблюдения. Малая подвижность сперматозоидов изменялась за этот период менее существенно, общая подвижность значительно возрастала в первые 30 мин, затем снижалась до исходного уровня. При этом можно выделить более выраженный ответ активноподвижных форм сперматозоидов на воздействие препарата.

В контрольных образцах подвижность через 2 часа наблюдения во всех случаях сохранялась на исходном уровне.

Число живых форм сперматозоидов на протяжении времени проведения эксперимента в обоих случаях (астено- и нормозооспермия) сохранилось на исходном уровне 60 – 64%.

Таким образом, добавление МС в эякулят в пределах 30 – 60 мин. инкубации изменяло в разной степени все формы подвижности сперматозоидов. При увеличении времени инкубации эффект возрастания подвижности сперматозоидов не наблюдался.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты исследования воздействия МС на сперматозоиды с ведущей формой патоспермии – астенозооспермией показывают наличие существенных изменений основных функциональных параметров эякулята. Ответ сперматозоидов на воздействие МС в разных группах различен и по времени и по эффекту. Наиболее выражен рост подвижности во фракции активноподвижных сперматозоидов в первые 30 – 60 мин опыта. Через 2 часа во всех образцах эякулята, включая контроль, подвижность возвращалась к исходному уровню. Через 24 часа наблюдения все виды подвижности снижались до 20-50% по отношению к исходному уровню, в контроле – до 2-60%.

В настоящее время механизм восстанавливающего и стимулирующего действия препарата на различные клетки окончательно не ясен, однако, в литературе имеются указания на то, что эти свойства в определенной степени связаны с влиянием на кальциевый гомеостаз и функциональное состояние митохондрий [17,18].

Таблица 1. Влияние метиленовой сини на подвижность сперматозоидов при исходной астенозооспермии (общая подвижность – менее 40%)

Table 1. The effect of methylene blue on sperm motility in the initial asthenozoospermia (total motility – less than 40%)

Параметры эякулята Parameters of ejaculate	Исходные данные Initial data	ВРЕМЯ ИНКУБАЦИИ TIME OF INCUBATION			Контроль через 2 часа Control after 2 hours
		30 мин 30 min	60 мин 60 min	2 часа 2 hours	
Активная подвижность, % Active mobility,%	14,7±2,6 (100%)	25,3±4,2 (172%)*	12,8±3,1 (87%)	14,6±2,7 (100%)	14,8±1,8 (100%)
Малая подвижность, % Low mobility,%	22,0 ±2,2 (100%)	24,6±3,1 (111%)	17,6±4,2 (80%)	15,3±4,5 (69%)	24,0±2,5 (109%)
Общая подвижность General mobility	36,7±3,4 (100%)	49,9±5,7 (135%)*	30,4±4,2 (82%)	29,9±3,7 (81%)	38,8 %±3,8 (105%)

* различия величин подвижности по сравнению с исходным уровнем достоверны ($p < 0,05$).

Таблица 2. Влияние метиленовой сини на подвижность сперматозоидов при исходной нормозооспермии (общая подвижность – менее 40%)

Table 1. The effect of methylene blue on sperm motility in the initial normozoospermia (total motility – less than 40%)

Параметры эякулята Parameters of ejaculate	Исходные данные Initial data	ВРЕМЯ ИНКУБАЦИИ TIME OF INCUBATION			Контроль через 2 часа Control after 2 hours
		30 мин 30 min	60 мин 60 min	2 часа 2 hours	
Активная подвижность, % Active mobility,%	28,1%±4,8 (100%)	53,2 ±5,1 (189%)*	38,0±4,6 (135%)*	31,0±3,8 (110%)	24,6±4,3 (87%)
Малая подвижность, % Low mobility,%	29,2±4,7 (100%)	28,0 %±3,9 (95%)	22,5 %±3,6 (77%)	28,0±4,2 (95%)	28,0±3,8 (96%)
Общая подвижность General mobility	57,3±5,6 (100%)	81,2±5,1 (141%)*	60,5%±3,8 (105%)	59,0±4,0 (102%)	52,6±3,3 (91%)

* различия величин подвижности по сравнению с исходным уровнем достоверны ($p < 0,05$).

Было показано, что МС способен снижать нарушения органных функций крыс в результате воздействия ряда повреждающих факторов. В экспериментах *in vitro* показано, что МС эффективно снижает гибель культивированных нейронов, вызванную паракватом или ионами цинка, токсическое действие которых направлено на митохондрии [19,20].

Кроме того, как известно, подвижность сперматозоидов обеспечивается за счет энергии гликолиза, одним из ферментов которого является глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа – ГАФДс, прочно связанная в сперматозоиде с фиброзным слоем жгутика [21]. По мнению авторов, подвижность сперматозоидов в существенной степени зависит от активности этого фермента, который весьма чувствителен к поврежда-

ющему действию активных форм кислорода (АФК). Это позволяет предположить, что возрастания подвижности сперматозоидов можно добиться с помощью ряда агентов (в том числе, возможно, и некоторых регуляторных пептидов), снижающих повышенную продукцию АФК, которая отмечается при ряде урологических заболеваний, в том числе органов урогенитальной системы.

Таким образом, проведенные исследования выявили способность МС стимулировать подвижность сперматозоидов человека в эксперименте. Хотя механизм наблюдаемого эффекта остается пока неясным, полученные данные показывают перспективность проведения дальнейших работ по изучению возможности использования препарата в андрологической и репродуктивной практике. ■

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Щеплев П.А. Андрология. Клинические рекомендации. М., Медпрактика. 2007. 154 с. (Scheplev P.A. Andrology. Clinical recommendations. M., medical practice. 2007.154 s.)
2. Кулаков В.И. Вспомогательные репродуктивные технологии - настоящее и будущее. М. Медицинское. 2005. С. 11-15. (Kulakov V.I. Assisted reproductive technologies - present and future. M. Medical news. 2005.P. 11-15.)
3. Пашкова Е.Ю., Калинченко С.Ю. Мужское бесплодие в XXI веке – реалии и перспективы. Эффективная фармакотерапия. Урология и нефрология 2013;(1): 26-32. (Pashkova E.Yu., Kalinchenko S.Yu. Male infertility in the 21st century - realities and prospects. Effective pharmacotherapy. Urology and Nephrology 2013; (1): 26-32.)
4. Виноградов И.В., Габлия М.Ю. Роль мужского фактора при анализе неудач в протоколах ВРТ. URL: <http://uronews.ru/2012/10/vliyanie-muzhskogo-faktora-na-veroyatnost-neudachi-v-protokole-vrtl/>. (Vinogradov I.V., Gabliya M.Yu. The role of the male factor in the analysis of failures in ART protocols. URL: <http://uronews.ru/2012/10/vliyanie-muzhskogo-faktora-na-veroyatnost-neudachi-v-protokole-vrtl/>)
5. Овчинников Р.И., Гамидов С.И. Причины репродуктивных потерь у мужчин – фрагментация ДНК сперматозоидов. РМЖ 2015;(11):634-638. (Ovchinnikov R.I., Hamidov S.I. The causes of reproductive loss in men are sperm DNA fragmentation. RMJ 2015; (11): 634-638.)
6. Быков В.Л. Сперматогенез у мужчин в конце XX века (обзор литературы). Проблемы репродукции 2000;(1): 6-13. (Bykov V.L. Spermatogenesis in men at the end of the twentieth century (literature review). Reproduction Problems 2000; (1): 6-13.)
7. Келлэт Е.П., Корнеева И.Е., Шуршалина А.В. Бесплодие неясного генеза: фокус современных научных исследований. Проблемы репродукции 2010;(1): 32-35. (Kellat E.P., Korneeva I.E., Shurshalina A.V. Infertility of unknown origin: the focus of modern scientific research. Reproduction Issues 2010; (1): 32-35.)
8. Евдокимов В.В., Захариков С.В., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф., Туровецкий В.В. Влияние регуляторных пептидов на подвижность сперматозоидов человека *in vitro*. Экспериментальная и клиническая урология 2016;(2):67-69. (Evdokimov V.V., Zakharikov S.V., Andreeva L.A., Myasoedov N.F., Turovetsky V.B. The effect of regulatory peptides on *in vitro* human sperm motility. Experimental and clinical urology 2016; (2): 67-69.)
9. 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 in

- bioregulation. The mechanism of action of membranotropic homeostatic tissue-specific bioregulators. Saarbrücken Lambert Academic Publishing, 2012.127 p.)
10. Wood BL, Doncel GF, Reddy PR, Sokal DC. Effect of diltiazem and methylene blue on human sperm motility, viability and cervical mucus penetration: potential use as vas irrigants at the time of vasectomy. *Contraception* 2003;67(3):241-5.
11. Chandler JE, Harrison CM, Canal AM. Spermatozoal methylene blue reduction: an indicator of mitochondrial function and its correlation with motility. *Theriogenology* 2000;15;54(2):261-71.
12. Wainwright M, Amaral L. The phenothiazinium chromophore and the evolution of antimalarial drugs. *Trop Med Int Health* 2005;10(6):501-511. doi: 10.1111/j.1365-3156.2005.01417.x
13. Watts LT, Lloyd R, Garling, R.J. Stroke neuroprotection: targeting mitochondria. *Brain Sci* 2013;3(2):540-560. doi: 10.3390/brainsci3020540.
14. Oz M, Lorke DE, Petroianu GA. Methylene blue and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* 2009. 78, 927-932.
15. Стельмашук Е.В., Генрикс Е.Е., Мухалева Е.В., Скребицкий В.Г., Исаев Н.Л. Нейропротекторное действие метиленовой сини *in vivo* и *in vitro*. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2019;167(4): 438-443. (Stelmashuk E.V., Genrikhs E.E., Mukhaleva E.V., Skrebitsky V.G., Isaev N.L. Neuroprotective effect of methylene blue *in vivo* and *in vitro*. *Bulletin of experimental biology and medicine* 2019; 167 (4): 438-443.)
16. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. 5-е изд. 2012. М.: 291 с. (WHO guidelines for the study and treatment of human ejaculate. 5th ed. 2012, M.: 291 c.)
17. Potet E, Winters A, Yan LJ, Yang SH. Neuroprotective action of methylene blue and its derivatives. *PLoS One* 2012;7(10):e48279. doi: 10.1371/journal.pone.0048279.
18. Zhao M, Liang F, Xu H, Yan W, Zhang J. Methylene blue exerts a neuroprotective effect against traumatic brain injury by promoting autophagy and inhibiting microglial activation. *Mol Med Rep* 2016;13(1):13-20. doi: 10.3892/mmr.2015.4551
19. Sharpley MS, Hirst J. The inhibition of mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) by Zn²⁺. *J Biol Chem* 2006;281(46):34800-9.
20. Suh SW, Chen JW, Motamedi M, Bell B, Listiak K, Pons NF, et al. Evidence that synaptically - released zinc contributes to neuronal injury after traumatic brain injury. *Brain Res* 2000;852(2):268-273.
21. Шуцкая Ю.Ю., Элькина Ю.Л., Муронец В.И. Исследование глицеральдегид - 3-фосфатдегидрогеназы из сперматозоидов человека. *Биохимия* 2008;73(2):228-236. (Shutskaya Yu.Yu., Elkina Yu.L., Muronets V.I. The study of glyceraldehyde - 3-phosphate dehydrogenase from human sperm. *Biochemistry* 2008; 73 (2): 228-236.)

Сведения об авторах:

Евдокимов В.В. – д.м.н., гл. научный сотрудник отдела андрологии и репродукции человека НИИ урологии и интервенционной радиологии им.Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, vveddok@mail.ru. AuthorID 543052

Evdokimov Valeriy V. – Dr. Med. Sc., chief researcher at the department of andrology and human reproduction of N. Lopatkin Scientific Research Institute of Urology and Interventional Radiology – Branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of Russian Federation. vveddok@mail.ru, ORCID 0000-0001-5673-4810

Исаев Н.К. – д.б.н., ведущий научный сотрудник, Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, NikIsaev@mail.ru; AuthorID 89160

Isaev N.K. – Dr.Biol. Sc., Leading Researcher, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, NikIsaev@mail.ru

Туровецкий В.В. – к.б.н., старший научный сотрудник МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, vturovet@rambler.ru, AuthorID 85978

Turovetsky Valery V. – Ph.D., Senior Researcher of Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, vturovet@rambler.ru, ORCID 0000-0001-8427-163

Пирутин Сергей Константинович – к.б.н., старший научный сотрудник МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Pirutin S.K.@yandex.ru, AuthorID 91321

Pirutin Sergey K. – Ph.D., Senior Researcher of Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Pirutin S.K.@yandex.ru

Вклад авторов:

В.В. Евдокимов – разработка дизайна исследования
Н.К. Исаев – разработка дизайна исследования, определение аспектов, представляющих наибольший научный и практический интерес
В.В. Туровецкий – анализ релевантных научных публикаций по теме, сбор и анализ данных
С.К. Пирутин – получение и анализ статистических данных, написание текста рукописи,

Authors' contributions:

В.В. Evdokimov – developing the research design
Н.К. Isaev – developing the research design, identification of aspects of the highest scientific and practical interest
В. В. Turovetsky – analysis of relevant literature, data collection and analysis
С.К. Pirutin – obtaining and analyzing statistical data, article writing

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: 27.07.19.
Received: 27.07.19.

Принята к публикации: 19.08.19.
Accepted for publication. 19.08.19.