

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 577.152.34:582.282.123.4

Изучение спектра активности новых штаммов микромицетов рода *Aspergillus* в отношении белков системы гемостаза

А.А. Осмоловский^{1, *} , А.А. Шестакова¹, Д.Е. Суркова^{1, 2}, Р. Лехотска³, Е. Пецкова³¹Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²Факультет биологии и биотехнологии, Высшая школа экономики, Россия, 101100, г. Москва, ул. Мясницкая д. 20;³Department of Microbiology, Slovak Medical University in Bratislava, 12 Limbova st., Bratislava, 83303, Slovakia

*e-mail: aosmol@mail.ru_

Изучен спектр активности внеклеточных протеаз в отношении белков системы гемостаза для пяти видов микромицетов рода *Aspergillus*. Показано отсутствие типов активности, подобных компонентам системы гемостаза — тромбину, плазмину, фактору Ха, урокиназе и протеину С — а также активаторной активности по отношению к предшественникам человеческих гемостатических протеаз для *A. thecicus*, *A. caespitosus*, *A. glaucus*, *A. tamaritii* и *A. wentii*. Для *A. glaucus* показано наличие протеаз, высокоактивных (58,52 Е_{тир}) и высоко-специфичных в отношении фибриногена, а для *A. thecicus*, *A. caespitosus* и *A. wentii* — способность синтезировать протеазы, активные в кислых областях pH.

Ключевые слова: протеазы микромицетов, фибринолитические ферменты, тромболитические средства, активаторы белков гемостаза, хромогенные пептидные субстраты, аспергиллы

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-2-7

Микромицеты рода *Aspergillus* известны как продуценты протеаз, активных в отношении разнообразных субстратов. Хорошо изучены фибринолитические протеазы, синтезируемые *A. oryzae*, *A. terricola*, *A. kanagawaensis*, *A. ustus* и многими другими видами [1–5] и перспективные как тромболитические препараты экстренного действия. Кроме того, для некоторых протеаз показана активаторная активность по отношению к белкам системы гемостаза, опосредующая не прямой фибринолиз: протеаза *A. ochraceus* способна активировать протеин С, протеаза *A. terreus* — прекалликреин [6, 7]. Такие ферменты, несмотря на то что выявляются у продуцентов довольно редко [8], признаются перспективными агентами для диагностик, используемых при выявлении заболеваний системы гемостаза ввиду уникальности их протеолитического действия. Низкая стоимость культивирования, простота выделения и очистки, а также ограниченная субстратная специфичность секретируемых протеаз делают микромицеты рода *Aspergillus* перспективными продуцентами таких ферментов для биомедицины и фармацевтической промышленности.

В данной работе была исследована способность пяти представителей рода *Aspergillus* секретировать протеолитические ферменты с активностью в отношении белков системы гемостаза. Для данных видов изучение протеолитической активности проводилось впервые.

Материалы и методы

Объекты исследования. Объектами исследования были штаммы микромицетов *A. thecicus*, *A. caespitosus*, *A. glaucus*, *A. tamaritii* и *A. wentii* из коллекций медицинского факультета Словацкого медицинского университета в г. Братислава. Поддержание штаммов осуществляли в пробирках на скошенном сусле-агаре. В качестве посевного материала использовали культуры, выращенные в течение 7 сут.

Глубинное культивирование микромицетов. Культивирование микромицетов проводили в глубоких условиях в шейкере-инкубаторе ES-20/80 (BioSan, Латвия) при 200 об./мин в качалочных колбах объемом 750 мл со 100 мл питательной среды при 28°C в течение 48 ч на среде, содержащей сусло, глюкозу и пептон [9]. Далее 3% (об./об.) посевного материала переносили в среду № 1 (в %: глюкоза — 3,0, глицерин — 7,0, гидролизат рыбной муки — 0,5, NaNO₃ — 0,2, KН₂РO₄ — 0,05, MgSO₄ — 0,05, pH 6,0) и среду № 2 (в %: крахмал — 1,0, глюкоза — 3,5, гидролизат рыбной муки — 0,5, пептон — 0,5, MgSO₄ — 0,05, KН₂РO₄ — 0,05, NaCl — 0,2, pH 6,0) и культивировали в течение 4 сут. После культивирования культуральную жидкость отделяли от мицелия фильтрованием и использовали для определения протеолитической активности.

Определение протеолитической активности с белковыми субстратами. Активность внеклеточ-

ных протеаз определяли с различными белковыми субстратами. Для определения общей протеолитической активности использовали 0,2%-й раствор азоказеина (Merck, Германия), приготовленный на 0,1 М Трис-НСl буфере (рН 8,2) и на 0,1 М ацетатном буфере (рН 5,5). Для определения фибринолитической активности использовали 1%-й раствор фибриногена (Merck, Германия), приготовленный на 0,1 М Трис-НСl буфере (рН 8,2). Для определения гемоглобинолитической активности использовали 1%-ю суспензию гемоглобина (Merck, Германия), приготовленную на 0,1 М ацетатном буфере (рН 4,7). Для определения протеолитической активности по отношению к кислым фибриллярным белкам использовали 0,2%-ю суспензию голубого фибрина (Calbiochem, Германия), приготовленную на 0,1 М ацетатном буфере (рН 5,5). Реакции проводили при постоянном перемешивании (600 об./мин) при 37°C в термошейкере TS-100 (BioSan, Латвия). Для проведения реакции к 200 мкл субстрата добавляли 100 мкл культуральной жидкости. Для остановки реакции после 10 мин (для гемоглобина и фибриногена) или 30 мин (для азоказеина и голубого фибрина) инкубации добавляли 300 мкл 10%-й трихлоруксусной кислоты. Далее образцы центрифугировали в течение 10 мин при 14300 об./мин и в надосадочной жидкости измеряли оптическую плотность на спектрофотометре BioSpectrometer (Eppendorf, Германия). За единицу гемоглобино- и фибринолитической активности ($E_{\text{тир}}$) принимали количество фермента, высвобождавшее 1 мкг тирозина за 1 мин в условиях проведения реакции.

За единицы общей протеолитической ($E_{\text{азк}}$) и фибринолитической ($E_{\text{ф}}$) активности принимали количество фермента, которое вызывало изменение оптической плотности на 0,01 ед. в условиях проведения реакции.

Плазминоподобную и активаторную по отношению к плазминогену активность определяли по методу Аструпа—Мюллертца—Лансена с использованием фибриновых пластин [10]. Для приготовления пластины с фибрином 9 мл 0,47%-го раствора бычьего фибриногена (Merck, Германия) и 0,2 мл 0,4%-го раствора тромбина (приготовленных на 0,9%-м NaCl) смешивали и помещали в стеклянную чашку Петри для полимеризации. После часовой стабилизации одну пластину прогревали в течение 30 мин при 86°C для инактивации примеси плазминогена. Фибриновые пластины с нанесенными образцами (30 мкл) инкубировали при 37°C в течение 3 ч в термостате-инкубаторе Binder (Binder, Германия). После инкубации измеряли диаметры зон гидролиза на прогретых и не прогретых чашках. Для расчета активаторной по отношению к плазминогену активности диаметр зоны гидролиза на прогретой чашке вычитали из диаметра на не прогретой. За

единицу активности принимали количество фермента, формирующее зону гидролиза с площадью поверхности 1 мм².

Определение протеолитической активности с хромогенными пептидными субстратами. Активность внеклеточных протеаз микромицетов по отношению к белкам плазмы крови человека определяли в реакциях с хромогенными пептидными субстратами: Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (ChromozymTH) и H-D-Phe-Pip-Arg-pNA (S-2238) — субстраты тромбина; H-D-Val-Leu-Lys-pNA (S-2251) — субстрат пламина; Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (S-2765) и Bz-Ile-Glu(OR)-Gly-Arg-pNA (S-2222) — субстраты Ха-фактора плазмы крови человека; Glp-Gly-Arg-pNA (S-2444) — субстрат урокиназы; Glp-Pro-Arg-pNA (S-2366) — субстрат протеина С. Реакции проводили при постоянном перемешивании (600 об./мин) при 37°C в термошейкере TS-100 (BioSan, Латвия).

Для проведения реакции 200 мкл пробы добавляли к 50 мкл 0,05 М Трис-НСl (рН 8,2) и 100 мкл 0,05%-го субстрата, приготовленного на том же буфере, через 5 мин инкубации реакцию останавливали 200 мкл 50%-й уксусной кислоты. Оптическую плотность измеряли при длине волны 405 нм.

Активаторные активности по отношению к белкам плазмы крови человека определяли для образцов с низкой прямой активностью по описанному ранее методу [11]. За единицу активности ($E_{\text{рНА}}$) в обоих случаях принимали количество мкмоль п-нитроанилина, отщепившегося от хромогенного субстрата за 1 мин.

Результаты и их обсуждение

Протеолитическая активность использованных в работе штаммов микромицетов, определенная с белковыми субстратами, представлена в табл. 1.

Как видно из табл. 1, протеолитическую активность проявляли все штаммы аспергиллов, но наименьшие значения были установлены для микромицета *A. glaucus*, у которого единственная существенная активность наблюдалась в отношении фибриногена и достигала 58,52 $E_{\text{тир}}$ при культивировании на ферментационной среде № 1, что может свидетельствовать об узкой субстратной специфичности выделяемых этим продуцентом ферментов. Высокую фибринолитическую активность также показал *A. thecicus* (105,46 $E_{\text{тир}}$) при культивировании на среде № 2, что в сочетании с низкой общей протеолитической активностью (18,95 $E_{\text{азк}}$) также может указывать на узкую субстратную специфичность протеаз этого продуцента. *A. thecicus*, кроме того, оказался способен секретировать протеазы, активные в кислой области рН и специфично расщепляющие глобулярные, но не фибриллярные белки. Наибольшую гемоглобинолитическую активность показали

A. caespitosus и *A. wentii* (292,60 и 127,14 Е_{тир} соответственно), что уменьшает вероятность применения выделяемых ими ферментов в биомедицине и фармацевтике, но может быть использовано в промышленности. Фибринолитическая активность, определенная с голубым фибрином при рН 5,5, для всех штаммов не превосходила 10,1 Е_{тф}, что говорит о неспособности исследуемых микромицетов образовывать протеазы, активные в отношении фибриллярных белков в кислых областях рН. Общая протеолитическая активность, определенная с азоказеином при рН 8,2, была достаточно низкой (менее 29 Е_{азк}) для всех штаммов, кроме *A. wentii* (47,55 Е_{азк}).

Изучение спектра протеолитической активности выделяемых используемыми микромицетами

ферментов проводили с использованием хромогенных пептидных субстратов, расщепляемых белками системы гемостаза (тромбином, плазмином, фактором Ха, урокиназой и протеином С). Результаты представлены в табл. 2.

Исходя из значений, представленных в табл. 2, можно полагать, что микромицеты, использованные в исследовании, не обладают высокими активностями, подобным тем, что проявляются белками системы гемостаза. Незначительную плазминоподобную активность проявляли *A. glaucus* и *A. tamarii*, однако она не превышала 16 Е_{рНА}.

Результаты изучения способности внеклеточных протеаз исследуемых микромицетов активировать белки системы гемостаза представлены в табл. 3.

Таблица 1

Протеолитическая активность микромицетов, определенная с белковыми субстратами

Микромицет	Среда	Протеолитическая активность				
		Общая протеолитическая активность (рН 5,5), Е _{азк}	Общая протеолитическая активность (рН 8,2), Е _{азк}	Фибринолитическая активность, Е _{тир}	Гемоглоблинолитическая активность, Е _{тир}	Фибринолитическая активность (рН 5,5), Е _{тф}
<i>A. athecicus</i>	1	27,60	14,50	0,00	29,89	0,00
	2	72,05	18,95	105,46	22,95	0,00
<i>A. caespitosus</i>	1	2,55	28,35	0,00	84,20	0,00
	2	12,15	10,75	32,63	292,60	0,00
<i>A. glaucus</i>	1	0,00	0,00	58,52	0,00	3,00
	2	0,00	0,00	17,26	9,47	1,25
<i>A. tamarii</i>	1	6,25	6,30	0,00	15,99	0,00
	2	20,90	27,05	4,21	13,68	10,10
<i>A. wentii</i>	1	33,40	47,55	0,00	127,14	6,00
	2	18,95	6,15	17,89	26,10	0,00

Таблица 2

Прямая активность протеаз микромицетов в отношении хромогенных пептидных субстратов белков системы гемостаза

Микромицет	Среда	Активность, Е _{рНА}						
		Chromozym TM	S-2238	S-2251	S-2765	S-2222	S-2444	S-2366
<i>A. athecicus</i>	1	0,00	1,42±1,42	0,09±0,09	0,55±0,55	5,77±2,70	0,00	0,00
	2	2,58±0,32	0,96±0,15	2,93±0,03	1,07±0,44	0,00	0,93±0,06	2,78±0,32
<i>A. caespitosus</i>	1	0,03±0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,22±0,12
	2	2,12±0,44	0,09±0,09	0,17±0,03	0,93±0,06	0,00	0,00	1,25±0,09
<i>A. glaucus</i>	1	0,41±0,00	0,00	9,89±1,54	0,00	0,00	5,89±0,03	7,92±0,84
	2	7,19±1,86	6,50±1,39	15,60±1,33	7,48±0,17	0,75±0,32	8,50±0,55	8,70±0,15
<i>A. tamarii</i>	1	1,28±0,06	1,04±1,04	2,29±0,44	2,06±0,09	3,68±0,20	2,12±0,61	0,15±0,05
	2	5,42±0,20	3,54±0,46	10,41±3,86	2,35±0,26	0,00	0,70±0,12	0,00
<i>A. wentii</i>	1	6,06±0,61	0,00	0,75±0,29	0,55±0,32	0,26±0,03	0,78±0,20	0,00
	2	0,29±0,29	0,00	1,89±0,15	2,03±0,46	0,00	1,89±0,09	0,00

Данные табл. 3 свидетельствуют о том, что внеклеточные протеазы, выделяемые всеми используемыми в исследовании штаммами микромицетов рода *Aspergillus*, не обладают достаточными активаторными активностями по отношению к белкам системы гемостаза. Из пяти штаммов, исследованных на предмет проявления активаторной активности в отношении семи субстратов, только *A. athecicus* и *A. wentii* показали активность, превосходящую 10 ед. (14,97 и 10,20 Е_{pNA} соответственно). Однако такие величины активности не позволяют считать данных микромицетов биотехнологически перспективными.

Для изучения прямой фибринолитической и активаторной по отношению к плазминогену активности был использован метод Аструпа–Мюллертца–Лансена с использованием фибриновых пластин. Результаты представлены в табл. 4.

Наибольшую прямую фибринолитическую активность продемонстрировал *A. athecicus* при культивировании на ферментационной среде № 2 (402,93 Е). В то же время, при культивировании на этой же среде активаторная по отношению к плазминогену активность также была наивысшей среди наблюдаемых, что делает протеазы этого микромицета перспективными в качестве препарата для неотложной медицины, однако

потенциально ограничивает их использование для создания диагностикумов. Также выраженная фибринолитическая активность была показана для *A. caespitosus*, а активаторная по отношению к плазминогену – для *A. wentii*. Отсутствие фибринолитической и незначительная активаторная по отношению к плазминогену активность наблюдались для *A. glaucus*, что в сочетании с низкой протеолитической активностью, определенной с белковыми и хромогенными субстратами, доказывает, что использование данного микромицета как продуцента протеолитических ферментов нецелесообразно.

Полученные результаты могут быть объяснены происхождением использованных микромицетов: они были выделены из различных материалов, включая мышцы, кости, кожу и погребальную одежду из мумифицированных человеческих останков из склепа [12]. Поскольку склеп, в котором они были обнаружены, долгое время не вскрывался, метаболическая активность грибов в условиях ограниченного количества питательного субстрата должна быть крайне низкой. Два основных питательных субстрата, обнаруженные в склепе, представляют собой тела умерших и их одежду, то есть богатые белком и целлюлозой материалы. Вполне возможно, что низкая протеолитическая

Таблица 3

Активаторная активность протеаз микромицетов в реакциях с хромогенными пептидными субстратами белков системы гемостаза

Микромицет	Среда	Активность, Е _{pNA}						
		Chromozym TM	S-2238	S-2251	S-2765	S-2222	S-2444	S-2366
<i>A. athecicus</i>	1	0,00	0,64±0,36	0,00	0,00	0,00	2,78±0,18	0,00
	2	14,97±0,99	4,35±1,48	0,00	3,07±0,32	0,00	2,38±0,28	0,00
<i>A. caespitosus</i>	1	6,56±0,97	0,00	1,94±0,04	0,93	0,00	0,00	3,28±0,41
	2	0,00	0,00	0,00	1,33	0,00	1,54±0,08	0,00
<i>A. glaucus</i>	1	2,64±0,15	0,00	0,00	0,00	1,13±0,11	0,00	0,00
	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>A. tamarii</i>	1	0,00	0,52±0,08	1,45±0,09	0,00	0,00	4,29±1,00	2,78±2,78
	2	0,00	0,75±0,21	0,00	4,06±1,08	0,00	0,81±0,07	1,91±1,91
<i>A. wentii</i>	1	0,00	1,91±0,32	0,00	0,00	3,25±0,23	0,70±0,03	0,06±0,06
	2	10,20±0,43	0,41±0,12	0,75±0,20	0,00	0,00	3,60±0,021	0,00

Таблица 4

Фибринолитическая и активаторная к плазминогену активность протеаз аспергиллов

Микромицет	Фибринолитическая активность, усл.ед./мл		Активаторная к плазминогену активность, усл.ед./мл	
	Среда 1	Среда 2	Среда 1	Среда 2
<i>A. athecicus</i>	174,83±16,48	402,93±0,00	37,46±17,66	310,52±8,24
<i>A. caespitosus</i>	241,43±40,03	141,53±30,61	44,12±17,66	0,00
<i>A. glaucus</i>	0,00	0,00	0,00	14,15±20,01
<i>A. tamarii</i>	0,00	83,25±0,00	104,90±7,06	213,12±0,00
<i>A. wentii</i>	0,00	83,25±0,00	53,28±0,00	91,58±11,77

активность использованных штаммов объясняется метаболической спецификацией в отношении материалов одежды, а не мертвых тканей.

Таким образом, изучена активность внеклеточных протеаз для пяти видов микромицетов рода *Aspergillus*. Показано отсутствие активностей, подобных активности тромбина, плазмина, фактора Ха, урокиназы и протеина С, а также активаторных активностей в отношении этих белков. Продемонстрированы высокая и специфическая

фибриногенолитическая, фибринолитическая, а также активаторная по отношению к плазминогену активность для *A. thecicus*, а также высокая фибринолитическая активность для *A. caespitosus*.

Работа проведена без привлечения финансирования. Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shirasaka N., Naitou M., Okamura K., Fukuta Y., Terashita T., Kusuda M. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3. *Mycoscience*. 2012;53(5):354–364.
2. Zaikina N.A., Shataeva L.K., Elinov N.P., Samsonov G.V. Some properties of the protease from *Aspergillus terricola*. *Mycopathologia*. 1975;56(3):153–157.
3. Osmolovskiy A.A., Popova E.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Fibrinolytic and collagenolytic activity of extracellular proteinases of the strains of micromycetes *Aspergillus ochraceus* L-1 and *Aspergillus ustus* 1. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016;71(1):62–66.
4. Kotb E.H., Gamal E.A., Edries F.M. Screening for fibrinolytic filamentous fungi and enzymatic properties of the most potent producer, *Aspergillus brasiliensis* AUMC 9735. *Biologia*. 2015;70(12):1565–1574.
5. Yadav S., Siddalingeshwara K. Screening and biosynthesis of fibrinolytic enzyme from *Aspergillus japonicum*. *J. Drug Deliv. Ther.* 2015;5(6):60–62.
6. Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Kurakov A.V., Baranova N.A., Egorov N.S. *Aspergillus ochraceus* micromycetes-producers of extracellular proteinases-protein C activators of blood plasma. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2012;48(5):488–492.
7. Zvonareva E.S., Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Kotova I.B., Egorov N.S. Identification of targets for extracellular proteases activating proteins of the haemostatic system produced by micromycetes *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus terreus*. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2015;41(5):500–505.
8. Osmolovskiy A.A., Kurakov A.V., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Ability of extracellular proteinases of micromycetes *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus fumigatus*, and *Aspergillus sydowii* to affect proteins of the human haemostatic system. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017;72(1):20–24.
9. Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Kurakov A.V., Egorov N.S. Production of extracellular proteinases (protein C activators in blood plasma) by the micromycete *Aspergillus ochraceus* during submerged and solid-state cultivation. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2013;49(6):580–586.
10. Astrup R., Müllertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 1952;40(2):346–351.
11. Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Kurakov A.V., Baranova N.A., Egorov N.S. *Aspergillus ochraceus* micromycetes – producers of extracellular proteinases – protein C activators of blood plasma. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2013;45(5):488–492.
12. Šimonovičová A., Kraková L., Pangallo D., Majorošová M., Piecková E., Bodoriková S., Dörnhöferová M. Fungi on mummified human remains and in the indoor air in the Kuffner family crypt in Sládkovičovo (Slovakia). *Int. Biodeter. Biodegradat.* 2015;99:157–164.

Поступила в редакцию 27.03.2023

После доработки 18.05.2023

Принята в печать 29.05.2023

SHORT COMMUNICATION

Investigation of new *Aspergillus* strains as producers of hemostatically active proteases

A.A. Osmolovskiy^{1, *} , A.A. Shestakova¹, D.Ye. Surkova^{1, 2}, R. Lehotská³, E. Piecková³

¹Department of Microbiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia;

²Faculty of Biology and Biotechnology, Higher School of Economics University, 20 Myasnitskaya str., Moscow, 101100, Russia;

³Department of Microbiology, Slovak Medical University in Bratislava, 12 Limbova str., Bratislava, 83303, Slovakia

*e-mail: aosmol@mail.ru

For five species of *Aspergillus* micromycetes, the diversity of proteolytic activities against human hemostasis proteins was assessed. For every strain, absence of activities similar to hemostatic proteases – thrombin, plasmin, factor Xa, urokinase, and protein C was shown. In addition, no

activating activities towards precursors of the named proteases were demonstrated. For *A. glaucus*, proteases of high activity (58,52 U_{tyr}) and specificity against fibrinogen were found. *A. thecicus*, *A. caespitosus* и *A. wentii*, were capable of proteolysis at acidic pH.

Keywords: *proteases of micromycetes, fibrinolytic enzymes, thrombolytics, activators of human hemostatic proteins, chromogenic peptide substrates, Aspergillus*

Funding: The study was performed without financial support.

Сведения об авторах

Осмоловский Александр Андреевич — канд. биол. наук, доц. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: aosmol@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6672-0551>

Шестакова Анна Александровна — аппаратчик синтеза кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: anashestakova2001@gmail.com

Суркова Дарья Евгеньевна — аппаратчик синтеза кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: surkovadaria2002@gmail.com

Рената Лехотска — сотр. департамента общественного здоровья Словацкого медицинского университета в Братиславе. Тел.: +421 2/593 701 11; e-mail: elena.pieckova@szu.sk

Елена Пецкова — Ph.D., доц. департамента общественного здоровья Словацкого медицинского университета в Братиславе. Тел.: +421 2/593 701 11; e-mail: elena.pieckova@szu.sk