

УДК 577.1:547.96

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ СЕЛЕЗЕНКИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДЕФИЦИТЕ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА РАЗНОЙ ВЫРАЖЕННОСТИ

Абаленихина Ю.В., Фомина М.А.

ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава России», Рязань, e-mail: abaleniхина88@mail.ru

Изучено влияние L-NAME в дозе 25 и 200 мг/кг на окислительную модификацию белков селезенки крыс. Установлено, что в условиях моделирования дефицита синтеза оксида азота (II) увеличивается количество карбонильных производных белков и снижается содержание битирозина и окисленного триптофана. При использовании N-нитро-L-аргининметилового эфира в дозе 25 мг/кг уровень карбонильных производных белков селезенки крыс увеличивается по сравнению с контролем. Важно отметить, что статистически значимо увеличивается количество альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов, что свидетельствует о повреждении остатков аминокислот, обладающих основными свойствами. Под действием L-NAME в дозе 200 мг/кг происходит усугубление окислительного стресса, так как образуются вторичные маркеры – кетон-динитрофенилгидразоны и отмечается истощение резервно-адаптационного потенциала, таким образом, снижается возможность обновления протеинов селезенки крыс, что приводит к накоплению поврежденных, имеющих слабую функциональную активность белков.

Ключевые слова: окислительная модификация белков, L-NAME, битирозин, окисленный триптофан, селезенка

OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS RATS SPLEEN WITH EXPERIMENTAL NITRIC OXIDE SYNTHESIS DIFFERENT EXPRESSIONS

Abaleniхина Y.V., Fomina M.A.

Ryazan State Ivan Petrovich Pavlov Medical University, Ryazan, e-mail: abaleniхина88@mail.ru

The influence of L-NAME at the dose of 25 and 200 mg/kg on the oxidizing modification of the proteins of the rat's spleen was studied. It is stated that in the conditions of the simulation of the scarcity of the synthesis of the oxide of nitrogen(II) a quantity of carbonyl derived increases and the content of bityrozine and oxidized tryptophan is reduced. After using N-nitro-L-argininmethyl ester at the dose of 25 mg/kg the level of protein carbonyl derivatives of rat's spleen increases in comparison with the control group. It is important, that the amount of aldehyde- and ketone- dinitrophenylhydrazone significantly increases, which indicates about the damage of basic amino acids remains. The redoubling of oxidizing stress occurs under the action of L-NAME at the dose of 200 mg/kg because the second markers -ketone- dinitrophenylhydrazone are formed and accumulated.

Keywords: oxidative modification of proteins, L-NAME, bityrozine, oxidized tryptophan, spleen

Белки являются главными мишенями для активных форм кислорода и азота из-за своей высокой чувствительности к свободным радикалам [9] и распространенности в биологических материалах [10, 11], а также они ответственные за большинство функциональных процессов клетки, вследствие чего их окислительная модификация представляет значительный интерес. Карбонильные производные белков являются стабильными продуктами, которые образуются не только за счет окисления активными формами кислорода и азота, но и при взаимодействии продуктов свободно-радикального окисления липидов с остатками аминокислот в составе белков [2, 14].

В свою очередь оксид азота, с одной стороны, способен замедлять Fe^{2+} -индуцируемое перекисное окисление липидов [13], проявляя антиоксидантные свойства, а с другой стороны, при взаимодействии NO с анион-радикалом (O_2^-) образуется высокоактивное соединение пероксинитрит ($ONOO^-$), оказывающее повреждающее действие [17]. Угнетение

синтеза оксида азота, возможно, способно оказывать как прооксидантный, так и антиоксидантный эффект. Одним из антагонистов синтеза оксида азота является N-нитро-L-аргининметиловый эфир (L-NAME), представляющий собой неселективный ингибитор индуцибельной NO-синтазы.

Оксид азота (II) проявляет не только токсическое и защитное действие [20], но и является центральной молекулой иммунной системы [12], в формировании которой принимает участие периферический иммунокомпетентный орган – селезенка [5].

В связи с этим актуальным является изучение окислительной модификации белков селезенки крыс в условиях моделирования дефицита синтеза оксида азота (II).

Цель исследования: провести комплексную оценку продуктов спонтанной окислительной модификации белков селезенки крыс под действием L-NAME в дозе 25 и 200 мг/кг, определив глубину окислительного повреждения белков по концентрации стабильных модификаций триптофана и тирозина в белках, и оценить

резервно-адаптационный потенциал клеток селезенки.

Материалы и методы исследования

Исследование проводили на 24 конвенциональных половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой 280–320 граммов, которые были разделены на контрольную и экспериментальные группы. Первой экспериментальной группе ($n = 8$) ежедневно, в течение 7 дней внутрибрюшинно вводили L-NAME в дозе 25 мг/кг [4], второй экспериментальной группе ($n = 8$) внутрибрюшинно вводили L-NAME в дозе 200 мг/кг [19]. Контрольной группе животных ($n = 8$) в те же сроки осуществляли внутрибрюшинное введение физиологического раствора.

Содержание животных в виварии соответствовало «Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник» от 06.04.1993. Все манипуляции с животными, в том числе и выведение из эксперимента осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г.).

Немедленно после выведения животного из эксперимента ткань селезенки помещали в холодный 0,25 М раствор сахарозы в соотношении 1/10 и гомогенизировали в течение 35 секунд при 900 об/мин в гомогенизаторе Potter S. Описанные процедуры проводили при температуре не выше 4 °С.

Полученный гомогенат центрифугировали 10 мин при 1000 g для осаждения не полностью разрушенных клеток и ядер. Надосадочную жидкость центрифугировали 15 мин при 14000 g для удаления митохондрий, а затем полученный супернатант – дополнительно при 20000 g в течение 30 мин для получения чистой цитоплазматической (неседиментируемой) фракции, в которой и определяли окислительную модификацию белков.

Окислительную модификацию белков оценивали по методу R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой [1], после осаждения нуклеиновых кислот 10%-м раствором стрептомицина сульфата. Карбонильные производные окисленных белков регистрировали на спектрофотометре при следующих длинах волн: 254, 270, 280, 356 нм (альдегид-динитрофенилгидразоны нейтрального характера – АДНФГ_н), 363 и 370 нм (кетон-динитрофенилгидразоны нейтрального характера – КДНФГ_н), 428 и 430 нм (альдегид-динитрофенилгидразоны основного характера – АДНФГ_о) и 434, 524, 530, 535 нм (кетон-динитрофенилгидразоны основного характера КДНФГ_о). Перечисленные длины волн выбраны в соответствии с диапазонами, в которых регистрируются динитрофенилгидразоны. Из данных литературы известно, что для АДНФГ_н спектр поглощения зарегистрирован в диапазоне 230–558 нм, АДНФГ_о – в диапазоне 258–264 и 428–520 нм, для КДНФГ_н спектр поглощения 363–367 нм, КДНФГ_о – 430 – 434 и 524–535 нм [1].

По полученным значениям экстинкций строили спектр окислительной модификации белков и подсчитывали площадь под кривой [8], выраженной в условных единицах на грамм белка (у.е./г белка).

Содержание битирозина и окисленного триптофана определяли флуориметрическим методом. Окислительная модификация тирозиновых остатков белков измерялась по образованию битирозина, ко-

торый обладает характерной флуоресценцией [7]. Окисление триптофановых остатков сопровождается снижением флуоресценции, характерной для триптофана [18].

Для каждой выборки вычисляли характеристики: медиану (Me), квартиль 1 и квартиль 3 [Q1; Q3]. Поскольку отмечалось отсутствие согласия данных с нормальным распределением, для оценки достоверности различий независимых выборок использовали ранговый критерий Манна–Уитни (U-тест).

Результаты исследования и их обсуждение

Из данных, приведенных на рис. 1, следует, что под действием L-NAME в дозе 25 мг/кг уровень карбонильных производных увеличивается по сравнению с контролем. Важно отметить, что статистически значимое увеличение динитрофенилгидразонов отмечено в диапазонах 428–430, 434–520 нм что составит площадь АДНФГ_о: 430–434, 520–535 нм – площадь КДНФГ_о. Из этого следует, что образование карбонильных производных белков под действием L-NAME в малой дозе происходит преимущественно за счет окисления остатков аминокислот, обладающих основными свойствами, о чем свидетельствует преобладание АДНФГ и КДНФГ основного характера.

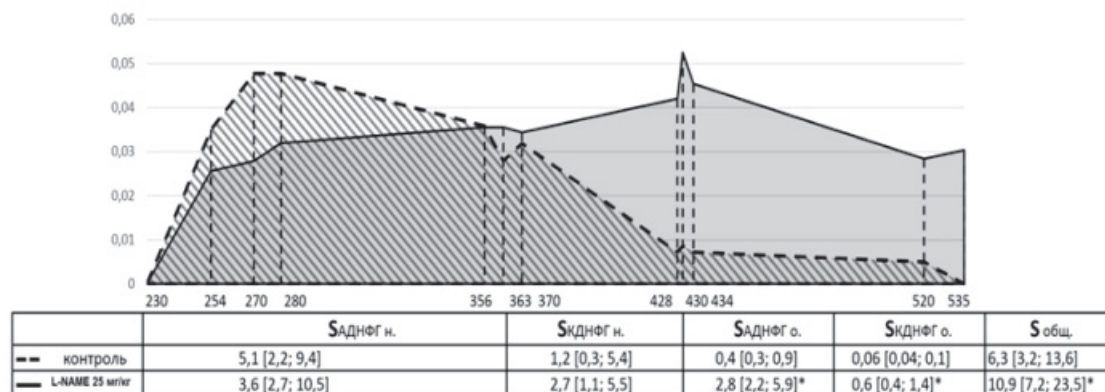
Что же касается влияния L-NAME в дозе 200 мг/кг, то отмечалось также повышение окислительной модификации белков по сравнению с контролем: достоверно значимые различия отмечались для КДНФГ нейтрального характера и АДНФГ и КДНФГ основного характера (рис. 2). Данный факт позволяет предположить, что мишенью помимо основных становятся и нейтральные остатки аминокислот.

В дозе 200 мг/кг L-NAME способствует преобладанию вторичных маркеров окислительного стресса – КДНФГ нейтрального характера по сравнению с дозой 25 мг/кг (рис. 3). Таким образом, L-NAME в дозе 200 мг/кг способствует усугублению окислительных процессов, о чем свидетельствует активный переход первичных маркеров окислительного стресса во вторичные.

Известно, что существует несколько путей образования карбонильных производных белков, одним из которых является прямое воздействие на аминокислотные остатки боковых цепей активных форм кислорода [2, 10], генерация которых в условиях угнетения синтеза оксида азота (NO) может происходить за счет подавления антиоксидантной системы, а именно каталазы и α -токоферола [16]. Известно, что перекисное окисление липидов также ингибируется благодаря взаимодействию NO с алкилпероксильными и алкоксильными радикалами [6]. А именно поэтому

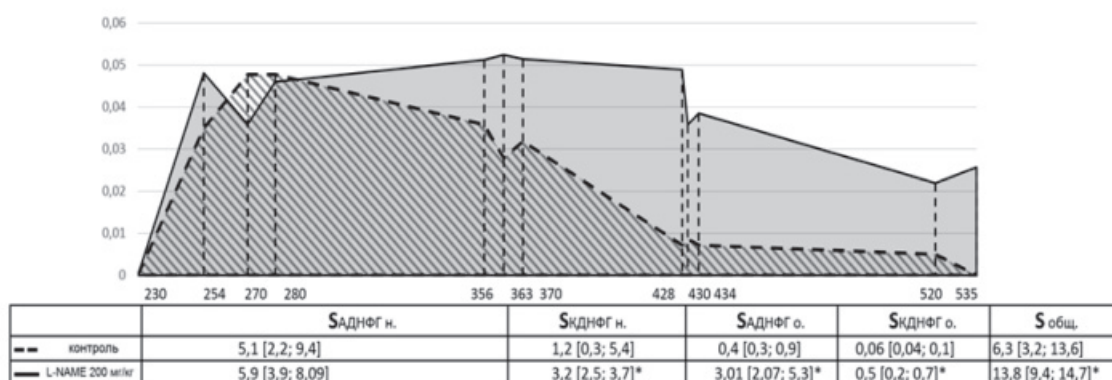
в условиях моделирования дефицита синтеза оксида азота (II) образование карбонильных производных может происходить за

счет взаимодействия продуктов свободно-радикального окисления липидов с остатками аминокислот в составе белков [1, 15].



Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

Рис. 1. Спектр окислительной модификации белков и значения площадей под кривыми групп контроля и L-NAME 25 мг/кг селезенки крыс



Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$)

Рис. 2. Спектр окислительной модификации белков и значения площадей под кривыми групп контроля и L-NAME 200 мг/кг селезенки крыс

Следует отметить, что при взаимодействии активных форм кислорода со сложными белками происходит модификация полипептидной цепи и небелкового компонента, который чаще всего имеет в своем составе негемовое железо [1], данный процесс получил название металл-катализируемого окисления [9]. Однако избыток NO способен связываться с ионами Fe^{2+} , а именно низкомолекулярные динитрозильные комплексы негемового железа (ДНКЖ) являются переносчиками NO, а белковые ДНКЖ – стабильными депо оксида азота [6]. В условиях модуляции дефицита синтеза оксида азота возможна деструкция связанных с белком ДНКЖ, в результате чего

образуются ассоциированные с белковой цепью свободные радикалы [6], способные оказывать повреждающее действие.

В результате окислительной модификации белков происходит не только формирование карбонильных групп, но и изменение флуоресценции белков [9].

Из результатов, приведенных в таблице, следует, что в экспериментальных группах происходит снижение образования битирозина. Незначительный уровень окисленного тирозина свидетельствует о том, что процессы агрегации белковых молекул не преобладают. О снижении процессов фрагментации в условиях данных экспериментальных моделей свидетельствует

понижение образования окисленного триптофана, так как наблюдается статистически значимое повышение флуоресценции данной аминокислоты (таблица).

Показатели изменения флуоресценции белков в гомогенате селезенки крыс контрольной и экспериментальных групп (Me [Q₁; Q₃])

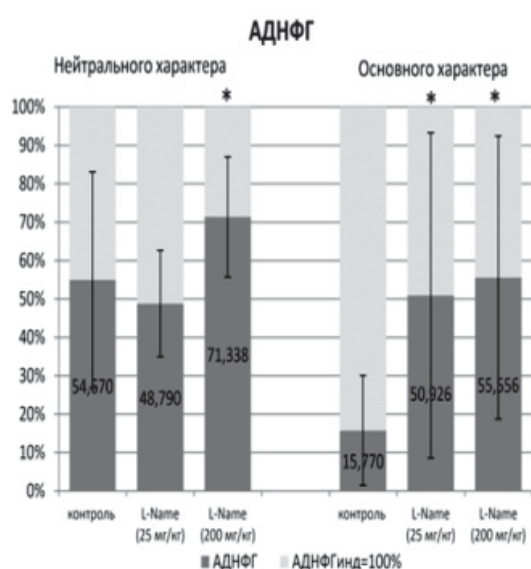
Показатель	Контроль (n = 8)	L-NAME 25 мг/кг (n = 8)	L-NAME 200 мг/кг (n = 8)
Битирозин, интенсивность флуоресценции, ед. на 1 г белка	0,15 [0,14; 0,17]	0,11 [0,09; 0,13]*	0,12 [0,10; 0,13]*
Триптофан, интенсивность флуоресценции, ед. на 1 г белка	0,31 [0,29; 0,33]	0,71 [0,69; 0,73]*	0,71 [0,61; 0,76]*

Примечание. * – статистически значимые отличия от контрольной группы (p < 0,05)

Опасность формирования белковых фрагментов и агрегатов заключается в том, что они способны ингибировать протеолитическую систему [14]. Снижение присутствия нерепарируемых стабильных модификаций триптофана и тирозина в белках в условиях модуляции дефицита синтеза NO можно считать позитивной ролью влияния L-NAME в дозе 25 и 200 мг/кг на селезенку. Таким образом, можно выделить потенциально важную роль карбонильных производных белков, которые более чувствительны к протеолизу, чем их нативные аналоги [14]. Карбонильные производные протеинов способны направляться в про-

теолитическую систему, что будет способствовать обновлению белков и утилизации поврежденных. Для оценки данного процесса можно использовать параметр резервно-адаптационного потенциала.

Оценка резервно-адаптационного потенциала производилась путем подсчета соотношения площадей под кривой карбонильных производных белков при спонтанном окислении протеинов к индуцированному по реакции Фентона, предполагая, что КДНФГ_{спонт} и АДНФГ_{спонт} равно 100% [3]. График зависимости полученных данных от вводимой дозы L-NAME представлен на рис. 4 и 5.



Примечание. * – статистически значимые отличия от контрольной группы (p < 0,05)

Рис. 3. Отношение площади под кривой альдегид-динитрофенилгидразонов, полученных при спонтанном окислении, к площади, полученной при индуцированном окислении белка



Рис. 4. Отношение значений кетон-динитрофенилгидразонов, полученных при спонтанном окислении, к значениям, полученным при индуцированном окислении белка

Из представленных рис. 4 и 5 следует, что статистически значимые различия между резервно-адаптационным потенциалом контрольной и экспериментальных групп отмечено для АДНФГ и КДНФГ основного характера, при этом между экспериментальными группами статистически значимые различия не отмечаются. Следовательно, внутривнутрибрюшинное введение L-NAME в дозе 25 и 200 мг/кг приводит к накоплению АДНФГ и КДНФГ основного характера независимо от дозы, и еще АДНФГ и КДНФГ нейтрального характера при введении дозы 200 мг/кг. Полученная тенденция отражает снижение возможности обновления белков селезенки крыс, что приводит к накоплению поврежденных, имеющих слабую функциональную активность белков.

Выводы

1. L-NAME способствует образованию карбонильных производных белков по сравнению с контролем: в дозе 25 мг/кг АДНФГ и КДНФГ основного характера, а в дозе 200 мг/кг дополнительно КДНФГ нейтрального характера, при этом отмечается снижение резервно-адаптационного потенциала клеток иммунокомпетентных органов.

2. L-NAME в дозе 200 мг/кг способствует усугублению окислительных процессов по сравнению с дозой 25 мг/кг за счет преобладания вторичных маркеров (КДНФГ нейтрального характера).

3. Моделирование дефицита синтеза оксида азота препятствует образованию битирозина и окисленного триптофана, изменения не зависят от вводимой дозы.

4. Под действием N-нитро-L-аргининметилового эфира происходит независимое от дозы накопление АДНФГ и КДНФГ основного характера, накопление АДНФГ и КДНФГ нейтрального характера происходит под действием дозы 200 мг/кг, что свидетельствует об истощении резервно-адаптационного потенциала белков селезенки крыс.

Список литературы

1. Дубинина Е.Е. [и др.] Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения // *Вопр. мед. химии.* – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24–26.
2. Лушак В.И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма / В.И. Лушак // *Биохимия.* – 2007. – Т. 72, вып. 8. – С. 995–1017.
3. Никитина Ю.В., Мухина И.В. Изменения окислительных процессов в ткани головного мозга и крови крыс в раннем онтогенезе // *Вестн. Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского.* – 2009. – № 6 (1). – С. 124–131.
4. Покровский М.В. [и др.] Эндотелиопротекторные эффекты L-аргинина при моделировании дефицита окиси

азота // *Эксперим. и клинич. фармакология.* – 2008. – Т. 71, № 2. – С. 29–31.

5. Шапкин Ю.Г., Масляков В.В. Значение селезенки в иммунном статусе организма // *Анналы хирургии.* – 2009. – № 1. – С. 9–12.

6. Шумаев К.Б. Роль динитрозильных комплексов железа в защите биомолекул и клеточных структур от окислительного, нитрозативного и карбонильного стресса: автореф. ... д-ра биол. наук / К.Б. Шумаев. – М., 2010. – 50 с.

7. Фомина М.А., Абаленихина Ю.В., Фомина Н.В., Терентьев А.А. «Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях» заявка на патент № 2013 102618 (003624) от 21.01.13.

8. Amado R., Aeschbach R., Neukom H. Dityrosine: invitroproductionandcharacterization / R. Amado, R. Aeschbach, H. Neukom // *Methods Enzymol.* – 1984. – Vol. 107. – P. 377–388.

9. Čolak E. New markers of oxidative damage to macromolecules // *JMB.* – 2008. – P. 1–16.

10. Dalle-Donne I. [et al.] Proteins as biomarkers of oxidative stress in diseases: the contribution of redox proteomics // *Mass Spectrom Rev.* – 2005. – Vol. 24. – P. 55–99.

11. Hawkins Clare L., Philip E. Morgan, Michael J. Davies Quantification of protein modification by oxidants // *Free Radical Biology & Medicine.* – 2009. – Vol. 46. – P. 965–988.

12. Hummel G. [et al.] Nitric oxide as a cellular antioxidant: A little goes a long way // *Free Radical Biology & Medicine.* – 2006. – Vol. 40. – P. 501–506.

13. Nyström Thomas. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence / Thomas Nyström // *The EMBO Journal.* – 2005. – Vol. 24. – P. 1311–1317.

14. Ogino Keiki, Da-Hong Wang Biomarkers of Oxidative/Nitrosative Stress: An Approach to Disease Prevention // *Acta Med. Okayama.* – 2007. – Vol. 61, № 4. – P. 181–189.

15. Kumar S., Saravana Kumar M., Raja B. [et al.] Efficacy of piperine, an alkaloidal constituent of pepper on nitric oxide, antioxidants and lipid peroxidation markers in L-NAME induced hypertensive rats // *Int. J. Res. Pharm. Sci.* – 2010. – Vol. 1, № 3. – P. 300–307.

16. Szabó Csaba. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics / Csaba Szabó, Harry Ischiropoulos, Rafael Radi // *NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY.* – 2006. – Vol. 6. – P. 662–680.

17. Teale F.W.J. Ultraviolet fluorescence of proteins in neutral solution // *Biochem. J.* – 1960. – Vol. 76, № 2. – P. 381–388.

18. Thippeswamy T. [et al.] Nitric oxide, a biological double-faced janus- Is this good or bad? // *Histol Histopathol.* – 2006. – Vol. 21. – P. 445–458.

19. Wang Zun-Yi. Role of nitric oxide (NO) in ocular inflammation // *British Journal of Pharmacology.* – 1995. – Vol. 116. – P. 2447–2450.

20. Wink D.A. [et al.] Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response // *Journal of Leukocyte Biology* – 2011, 89: 873–891.

References

1. Dubinina E.E. [i dr.] Okislitel'naja modifikacija belkov syvorotki krvi cheloveka, metod ego opredelenija // *Vopr. med. himii.* 1995. T.41, no. 1. pp. 24–26.
2. Lushhak V.I. Svobodnoradikal'noe okislenie belkov i ego svjaz' s funkcional'nym sostojaniem organizma / V.I. Lushhak // *Biohimija.* 2007. T. 72, vyp. 8. pp. 995–1017.
3. Nikitina Ju. V., Muhina I. V. Izmenenija okislitel'nyh processov v tkani golovnogogo mozga i krvi krysv v rannem ontogenезе // *Vestn. Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo.* 2009. no. 6 (1). pp. 124–131.

4. Pokrovskij M.V. [i dr.] Jendotelioprotekturnye jeffekty L-arginina pri modelirovani deficit azota // Jeksperim. i klinich. farmakologija. 2008. T.71, no. 2. pp. 29–31.
5. Shapkin Ju.G., Masljakov V.V. Znachenie selezenki v immunnom statuse organizma // Annaly hirurgii. 2009. no. 1. pp. 9–12.
6. Shumaev K.B. Rol' dinitrozil'nyh kompleksov zheleza v zashhite biomolekul i kletochnyh struktur ot okislitel'nogo, nitrozativnogo i karbonilovogo stressa: avtoref. ... d-ra biol. nauk / K.B. Shumaev. M., 2010. 50 p.
7. Fomina M.A., Abalenihina Ju.V., Fomina N.V., Terent'ev A.A. «Sposob kompleksnoj ocenki sodержaniya produktov okislitel'noj modifikacii belkov v tkanjah i biologicheskikh zhidkostyah» zajavka na patent no. 2013 102618 (003624) ot 21.01.13.
8. Amado R., Aeschbach R., Neukom H. Dytirosine: in vitro production and characterization / R. Amado, R. Aeschbach, H. Neukom // Methods Enzymol. 1984. Vol. 107. pp. 377–388.
9. Čolak E. New markers of oxidative damage to macromolecules // JMB. 2008. pp. 1–16.
10. Dalle-Donne I. [et al.] Proteins as biomarkers of oxidative stress in diseases: the contribution of redox proteomics // Mass Spectrom Rev. 2005. Vol. 24. pp. 55–99.
11. Hawkins Clare L., Philip E. Morgan, Michael J. Davies Quantification of protein modification by oxidants // Free Radical Biology & Medicine. 2009. Vol.46. pp. 965–988.
12. Hummel G. [et al.] Nitric oxide as a cellular antioxidant: A little goes a long way // Free Radical Biology & Medicine. 2006. Vol.40. pp. 501–506.
13. Nyström Thomas. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence / Thomas Nyström // The EMBO Journal. 2005. Vol.24. pp. 1311–1317.
14. Ogino Keiki, Da-Hong Wang Biomarkers of Oxidative/Nitrosative Stress: An Approach to Disease Prevention // Acta Med. Okayama. 2007. Vol. 61, no. 4. pp. 181–189.
15. Kumar S., Saravana Kumar M., Raja B. [et al.] Efficacy of piperine, an alkaloidal constituent of pepper on nitric oxide, antioxidants and lipid peroxidation markers in L-NAME induced hypertensive rats // Int. J. Res. Pharm. Sci. 2010. Vol.1, no. 3. pp. 300–307.
16. Szabó Csaba. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics / Csaba Szabó, Harry Ischiropoulos, Rafael Radi // NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY. 2006. Vol. 6. pp. 662–680.
17. Teale F.W.J. Ultraviolet fluorescence of proteins in neutral solution // Biochem. J. 1960. Vol. 76, no. 2. pp. 381–388.
18. Thippeswamy T. [et al.] Nitric oxide, a biological double-faced janus- Is this good or bad? // Histo Histopathol. 2006. Vol. 21. pp.445–458.
19. Wang Zun-Yi. Role of nitric oxide (NO) in ocular inflammation // British Journal of Pharmacology. 1995. Vol. 116. pp. 2447–2450.
20. Wink D.A. [et al.] Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response // Journal of Leukocyte Biology 2011, 89: 873–891.

Рецензенты:

Емельянова А.С., д.б.н., профессор кафедры технологии производства и переработки продукции животноводства, ФГБОУ ВПО «Рязанский государственный агротехнологический университет имени П.А. Костычева», г. Рязань;

Рябков А.Н., д.м.н., доц. кафедры фармакологии с курсом фармации и фармакотерапии, ФДПО ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, г. Рязань.

Работа поступила в редакцию 17.01.2014.