

УДК 616.381-002-092.99-085.27:[547.461.42:547.854]:615.849.19

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ
НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И
КОМПЛЕКСНОГО СОЕДИНЕНИЯ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ
С 5-ОКСИ-6-МЕТИЛУРАЦИЛОМ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПЕРИТОНИТЕ**

**Срубиллин Д.В., Еникеев Д.А., Мышкин В.А., Исаков И.Д.,
Ряховский А.Е., Исакова А.В.**

*ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России»,
Уфа, e-mail: rectorat@bashgmu.ru*

Цель работы состояла в исследовании влияния низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) и комплекса янтарной кислоты (ЯК) с 5-окси-6-метилурацилом, применяемых отдельно и комбинированно, на содержание стабильных метаболитов оксида азота в плазме крови и моче, показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы печени при экспериментальном перитоните. Эксперименты проведены на крысах-самцах, у которых моделировали перитонит путем внутрибрюшинного введения 10% каловой взвеси в дозе 1,0 мл на 100 г массы. Использовали импульсное низкоинтенсивное лазерное излучение аппаратом АЛТ «Матрикс» на область проекции печени и хвостовой вены. Комплексное соединение ЯК с 5-окси-6-метилурацилом уменьшает образование супероксидного анион-радикала, обладает противогипоксической активностью. При развитии воспалительного процесса в брюшной полости усиливаются окислительные процессы в печени, что при недостаточности системы антиоксидантной защиты ведет к развитию «окислительного и нитрозилирующего стресса». Лечебная санация брюшной полости не обеспечивает коррекцию возникших нарушений. Применение НИЛИ в инфракрасной и красной области и комплекса ЯК с 5-окси-6-метилурацилом оказывает гепатопротекторное действие, влияя на нарушенное прооксидантно-антиоксидантное равновесие раньше и в большей степени, чем их отдельное применение. Данные эксперимента дают основание считать, что использование при перитоните комбинированной терапии, включающей лазерное излучение и комплекс ЯК с 5-окси-6-метилурацилом, патогенетически обосновано.

Ключевые слова: перитонит, лазерное излучение, янтарная кислота, оксид азота, перекисное окисление липидов

**PATHOGENETIC JUSTIFICATION OF LOW INTENSIVE LASER RADIATION
AND COMPLEX COMPOUND OF SUCCINIC ACID
WITH 5-OXY-6-METHYLURACIL IN EXPERIMENTAL PERITONITIS**

Srubilin D.V., Enikeyev D.A., Myshkin V.A., Isakov I.D., Ryahovsky A.E., Isakova A.V.
Bashkirian State Medical University, Ufa, e-mail: rectorat@bashgmu.ru

The purpose of work consisted in research of influence of the low-intensive laser radiation (LILR) and a succinic acid (SA) complex with 5-oxy-6-methyluracil, applied separately and is combined, on the maintenance of stable metabolites of oxide of nitrogen in plasma of blood and urine, indicators of lipid peroxidation and antioxidant system of a liver at experimental peritonitis. Experiments were carried on rats males in which peritonitis was simulated via intraperitoneal administration of 10% fecal suspension in a dose of 1,0 ml per 100 g weight. Impulse low intensive laser radiation (LILR) was applied on the projected site of the liver and tail vein using the «Matrix» device. Complex compound of SA with 5-oxy-6-methyluracil reduces education superoxidic radical anion, possesses antihypoxemic activity. With the development of inflammation in the abdominal cavity enhanced oxidative processes in the liver, with insufficient antioxidant defense system leads to the development of «oxidative stress and nitroziliryuyuschego». Medical treatment of the abdominal cavity does not correct the types of damage produced. Application of LLLT in the red and infrared region and complex SA with 5-hydroxy-6-methyluracil has hepatoprotective effect, affecting impaired prooxidant-antioxidant balance, earlier and to a greater extent than their separate use. The experimental data give reason to believe that the use of combination therapy with peritonitis, including laser radiation and complex SA with 5-hydroxy-6-methyluracil pathogenetically justified.

Keywords: peritonitis, laser radiation, succinic acid, nitric oxide, lipid peroxidation

Развитие перитонита сопровождается выраженным эндотоксикозом, патогенетические механизмы которого изучены недостаточно. В последние годы внимание исследователей при критических состояниях и при перитоните в частности уделяется изучению механизмов возникновения эндотелиальной дисфункции в результате нарушения продукции оксида азота, который имеет лишний электрон, что обуславливает его высокую химическую реактивность. Одно из ведущих

мест в развитии общих и местных нарушений в системе гомеостаза при перитоните занимают активные формы кислорода. Основными повреждающими факторами становятся супероксидный анион-радикал, гидроксильный радикал и перекись водорода, а мишенью их патогенного действия являются полиненасыщенные жирные кислоты мембранных фосфолипидов [3, 6, 8, 12].

Патогенетический подход к терапии любого состояния, основанный на изучении

его молекулярных механизмов, является одним из наиболее перспективных в повышении эффективности лечения. В этой связи помимо традиционных методов коррекции гомеостаза при перитоните обоснованным представляется введение в комплексное лечение фармакологических препаратов с антигипоксическим и антиоксидантным механизмами действия, а также некоторые субстраты окисления [3, 8]. Среди последних наиболее многообразные возможности в плане метаболической коррекции функционального состояния и резистентности организма дает янтарная кислота и препараты на ее основе. В этой связи заслуживает внимание новое соединение – комплекс янтарной кислоты (ЯК) с 5-гидрокси-6-метилурацилом, антиоксидантная и антигипоксическая активность которого была показана нами ранее [11, 14].

В медицинской практике в последние годы все шире применяют низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ). Анализ литературных данных свидетельствует, что НИЛИ оказывает противовоспалительный и спазмолитический эффект, купирует болевой синдром, активизирует иммунную систему, микроциркуляцию, способствует коррекции метаболических нарушений [1, 2, 4, 10]. Однако следует отметить, что до настоящего времени не систематизированы представления о молекулярно-клеточных механизмах лазерного воздействия на биосистемы. Многие аспекты, касающиеся механизмов действия лазерного излучения в инфракрасном спектре, на сегодняшний день остаются неясными. Поэтому мы сочли важным необходимость дальнейшей детализации эффектов действия лазерного излучения на некоторые звенья патогенеза перитонита для более обоснованного его применения.

Печень оказывается первым органом-мишенью, на который приходится основной удар токсемии. Являясь органом с высокой энергетической потребностью и интенсивным окислительным метаболизмом, печень в условиях окислительного стресса подвержена значительным нарушениям [13]. Именно развивающаяся печеночная недостаточность представляет наибольшую опасность и является причиной высокой летальности. Между тем в настоящее время остаются малоизученными некоторые патофизиологические вопросы морфофункциональных расстройств печени при перитоните в аспекте коррекции их препаратами, обладающими антиоксидантным и антигипоксическим действием с использованием сочетанного импульсного низкоинтенсивного лазерного излучения в инфракрасной и красной области.

В связи с этим целью нашего исследования было изучение влияния разделного и комбинированного применения низкоинтенсивного лазерного излучения и комплекса янтарной кислоты с 5-окси-6-метилурацилом на динамику содержания стабильных метаболитов оксида азота в плазме крови и моче, динамику показателей перекисного окисления липидов, антиоксидантной системы печени при экспериментальном перитоните.

Материалы и методы исследования

Проведены эксперименты с использованием 83 белых половозрелых, неинбредных крыс-самцов массой 220–250 г. Эксперименты проводились в соответствии с требованиями приказов № 1179 МЗ СССР от 10.10.83 г., № 267 МЗ РФ от 19.06.03 г. «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» и «Правила по обращению, содержанию, обезболиванию и умерщвлению экспериментальных животных». Перитонит у животных воспроизводили путем внутрибрюшинного введения 10% каловой взвеси в дозе 1,0 мл на 100 г массы. Через 8 часов после введения каловой взвеси у всех животных развивались симптомы перитонита: вялость, заторможенность, отказ от пищи, учащенное дыхание, вздутие живота. Животным контрольной группы ($n = 5$) внутрибрюшинно вводили стерильный физиологический раствор в той же дозировке. На животных 1-й группы ($n = 6$) изучали изменения, происходящие при самостоятельном динамическом развитии перитонита. У крыс 2, 3, 4 и 5 групп с целью лечения перитонита через 8 часов после введения каловой взвеси выполняли лапаротомию, оценивали возникшие патологические изменения в брюшной полости и санировали ее.

В течение эксперимента все группы животных при остром перитоните получали подкожно физиологический раствор в суточной дозе 40 мл на кг. Животные третьей группы также получали курс сочетанного воздействия импульсного НИЛИ с длиной волны 0,63 и 0,89 мкм. Использовался аппарат АЛТ «Матрикс» с зеркальной насадкой для воздействия в области печени контактной методикой (0,89 мкм, импульсная мощность 7 Вт, частота 80 Гц, доза 0,01 Дж/см²) и акупунктурной насадкой для надвенозного облучения крови в области хвостовой вены (0,63 мкм, импульсная мощность 5 Вт, частота 80 Гц, доза 0,012 Дж/см²). В четвертой группе дополнительно для фармакологической коррекции применяли комплексное соединение янтарной кислоты с 5-окси-6-метилурацилом, синтезированное по методике, разработанной в Институте органической химии УНЦ РАН д.х.н. В.П. Кривоноговым. Антиоксидант вводили внутрибрюшинно в режиме монотерапии в дозе 50 мг/кг ежедневно с интервалом 12 часов. В пятой экспериментальной группе животные получали комбинированную терапию, включающую лазерное излучение и комплекс янтарной кислоты с 5-окси-6-метилурацилом. Животных 2, 3, 4, 5 групп выводили из эксперимента на 1-е, 3-и и 5-е сутки после операции, животных 1 группы через 12, 24, 48 часов (по 6 животных в исследуемые сроки). Для обезбоживания использовали эфир для наркоза. Выводили животных из опыта путем

декапитации. Объектом биохимических исследований служили печень и плазма крови.

Для изучения состояния процессов липопероксидации использовали метод прямой спектрофотометрии. Принцип метода заключается в выделении нативных жирных кислот путем экстракции смесью равных объемов гептана и изопропанола с последующим измерением оптической плотности проб изопропаноловой фазы липидного экстракта при длинах волн 220, 232 нм. Поглощение при данных длинах волн отражает содержание изолированных двойных связей (ИДС) и диеновых конъюгатов (ДК) соответственно [5]. Степень окисленности (СО) липидов определяли по соотношению величины светопоглощения липидного экстракта при 232 нм к ее величине при 220 нм. Для определения малонового диальдегида (МДА) использовали метод М. Mihara (1980), заключающийся в образовании окрашенного комплекса при взаимодействии продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) с тиобарбитуровой кислотой, с помощью стандартного набора фирмы «Агат-Мед» (Россия).

Одновременно с процессами ПОЛ определяли активность ферментов антиоксидантной защиты: каталазы [7], супероксиддисмутазы [15], глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [16]. Систему водорастворимых антиоксидантов оценивали, определяя содержание церулоплазмина (ЦП) в плазме крови, учитывая его способность окислять р-фенилендиамин с образованием окрашенного комплекса, а также определяя количество восстановленного глутатиона (GSH) в печени, учитывая его способность реагировать с избытком аллоксана с образованием соединения, имеющего максимум поглощения при длине волны 305 нм.

Полученные параметры ПОЛ и антиоксидантной системы (АОС) были использованы для вычисления коэффициента ПОЛ/АОС по формуле:

$$K = (\text{ДК}i/\text{ДК}n \times \text{МДА}i/\text{МДА}n \times \text{СО}i/\text{СО}n) / (\text{ЦП}i/\text{ЦП}n \times \text{GSH}i/\text{GSH}n),$$

где i – уровень исследуемого параметра у крысы с перитонитом; n – уровень исследуемого параметра при физиологической норме.

О содержании оксида азота в плазме крови и моче судили по количеству стабильных конечных метаболитов $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ (UNO_x). Принцип метода заключается в одномоментном восстановлении нитратов в нитриты в присутствии VCl_3 и реакции диазотирования образовавшимся нитритом сульфаниламида с развитием розовой окраски [9]. Определение концентрации UNO_x в моче проводили с учетом объема последней за 12 часов.

Обработку полученных результатов проводили с применением методов вариационной статистики. После проверки нормальности распределения изучаемых параметров в сравниваемых группах определяли средние величины (M), ошибку средних величин (m). Оценку достоверности проводили по критерию Стьюдента (t). Минимальный уровень статистической значимости различий верифицировали при $p < 0,05$. Математическую обработку выполняли на компьютере с применением программного обеспечения Microsoft Excel.

Результаты исследования и их обсуждения

Исследование суммарного содержания нитратов и нитритов (UNO_x), в плазме

крови крыс 1-й группы, как следует из данных табл. 1, выявило существенное отклонение данных показателей по сравнению с контрольной группой. Уровень метаболитов NO через 12 часов после моделирования перитонита увеличивался в 6,55 раза ($p < 0,05$), в дальнейшем их концентрация несколько снижалась, оставаясь выше исходных показателей. Крысы первой группы при самостоятельном динамическом развитии перитонита погибали в течение 50–60 часов.

По мере развития воспалительного процесса в брюшной полости происходит накопление продуктов ПОЛ в ткани печени. Содержание диеновых конъюгатов гидроперекиси ненасыщенных жирных кислот, являющихся первичными молекулярными продуктами ПОЛ, у крыс первой группы увеличивается на 82,1% ($p < 0,05$) через 12 часов, и несколько снижается на 2-е сутки. Максимальное накопление МДА наблюдается на 2-е сутки эксперимента, увеличиваясь на 256,6% ($p < 0,05$). Обращает внимание, что высокому содержанию МДА на 2 сутки соответствуют относительно сниженные показатели ДК, что находит свое отражение в коэффициенте МДА/ДК, равному $232,6 \pm 13,4$ ($p < 0,05$), по которому в определенной степени можно судить об общей направленности и интенсивности процессов свободно-радикального окисления и характеризовать функциональное состояние антиоксидантной системы. Данный показатель свидетельствует об интенсивном переходе первичных в промежуточные и конечные продукты ПОЛ.

Защита от реакционных радикальных метаболитов в клетке обеспечивается антиоксидантными ферментами, которые сводят к минимуму концентрацию супероксидного радикала, перекиси водорода и резко уменьшают образование наиболее токсичного радикала OH^\bullet . Полнота антиоксидантной защиты обеспечивается совместным действием супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы, так как при дисмутации супероксидного радикала образуется биологически активный интермедиант кислорода – перекись водорода, разрушаемая каталазой и пероксидазой. По результатам проведенных исследований, активность каталазы и СОД у крыс 1-й группы прогрессивно уменьшалась к 2-м суткам эксперимента соответственно на 44% ($p < 0,05$) и 35,8% ($p < 0,05$). Известно, что избыток перекиси водорода в присутствии Fe^{+2} разрушается с образованием гидроксильного радикала. Для детоксикации двухвалентного железа в организме существует целая система окисления и связывания ионов железа.

В плазме крови эта система представлена церулоплазмином, который окисляет Fe^{+2} до Fe^{+3} кислородом без образования свободных радикалов, а также обладает способностью к дисмутации супероксидных радикалов. Церулоплазмин представляет собой медь-содержащий гликопротеид глобулиновой фракции сыворотки крови, синтезируемый главным образом в печени. Важно отметить его активную роль в транспорте меди, которая необходима для синтеза СОД. В результате проведенных исследований установлено снижение активности церулоплазмينا у животных 1-й группы, достигающее ко 2 суткам наблюдения 52,5% ($p < 0,05$). Данное обстоятельство может быть объяснено печеночной недостаточностью в результате нарастания эндогенной интоксикации, что

согласуется с работами других авторов, которые отмечали снижение содержания ЦП при длительной воспалительной токсемии [17]. При изучении изменений в системе «ПОЛ – антиоксидантная активность» важна не столько оценка абсолютных величин отдельных показателей, сколько их соотношение, представленное в виде коэффициента ПОЛ/АОС, отражающего состояние окислительного стресса [6]. При сохранении баланса в системе «ПОЛ-АОС» коэффициент $K = 1,0$. По результатам исследования у животных 1-й группы в 1-е сутки коэффициент увеличивается до 12,1 ($p < 0,05$), на 2-е – до 15,1 ($p < 0,05$). Значительное повышение коэффициента свидетельствует о выраженной недостаточности эндогенной коррекции ПОЛ.

Таблица 1

Показатели перекисного окисления липидов, антиоксидантной защиты в печени и содержание стабильных метаболитов оксида азота в плазме крови и моче у крыс 1 группы при самостоятельном динамическом развитии перитонита ($M \pm m$)

Исследуемый показатель	Интактные животные ($n = 6$)	Значение показателей на этапах исследования (от момента моделирования)		
		12 часов	24 часа	48 часов
ДК, ($\lambda = 232$) усл.ед. на 1 г ткани	$1,9 \pm 0,18$	$3,46 \pm 0,27^*$	$3,99 \pm 0,33^*$	$3,1 \pm 0,25^*$
ИДС, ($\lambda = 220$) усл.ед. на 1 г ткани	$6,4 \pm 0,2$	$7,9 \pm 0,34^*$	$8,64 \pm 0,45^*$	$8,32 \pm 0,42^*$
МДА мкмоль на 1 г ткани	281 ± 14	$356,9 \pm 27$	$542,3 \pm 41^*$	$721 \pm 53^*$
СОД, усл.ед. на 1 мг белка	$41,1 \pm 2,5$	$39,9 \pm 3,3$	$33,4 \pm 2,9$	$26,4 \pm 1,3^*$
Каталаза, мМоль в мин на 1 мг белка	$214,8 \pm 6,2$	$197,8 \pm 7,1$	$156,1 \pm 6,8^*$	$120,3 \pm 8,6^*$
Г6ФДГ, нМоль в мин на мг белка	$54,6 \pm 2,6$	$66,7 \pm 3,5^*$	$49,2 \pm 5,3$	$29,5 \pm 1,2^*$
Восстановленный глутатион, мг %	$149 \pm 5,3$	$143,8 \pm 6,3$	$116,9 \pm 4,7^*$	$83,2 \pm 3,2^*$
Церулоплазмин, мг %	$11,9 \pm 0,07$	$12,8 \pm 0,6$	$7,74 \pm 0,5^*$	$5,65 \pm 0,3^*$
Коэффициент МДА/ДК	$147,9 \pm 4,4$	$103,1 \pm 5,2^*$	$135,9 \pm 4,7$	$232,6 \pm 13,4^*$
Коэффициент ПОЛ/АОС	$1,0 \pm 0,1$	$0,98 \pm 0,1$	$12,2 \pm 1,3^*$	$15,1 \pm 1,4^*$
Содержание UNO_x в плазме крови, мкмоль/л	$17,6 \pm 0,7$	$115,3 \pm 6,5^*$	$65,3 \pm 3,6^*$	$45,7 \pm 2,9^*$
Содержание UNO_x в моче, мкмоль/12 часов	$88,9 \pm 6,4$	$127,4 \pm 9,2^*$	$95,7 \pm 10,1$	$103,5 \pm 7,8$

Примечание: * – различие достоверно ($p < 0,05$) по сравнению с интактными животными.

Необходимо учитывать, что повышение уровня оксида азота способствует повреждающему действию продуктов свободно-радикального окисления. Значительное снижение активности СОД к 2 суткам развития перитонита, а также усиленное образование оксида азота способствуют образованию пероксинитрита, который является интегрирующим звеном окислительного стресса, обладает большой реакционной способностью, повреждая клеточные структуры и нарушая функцию печени. Снижение концентрации оксида азота в плазме крови перед гибелью крыс можно связать с тем, что он вступал в сопряженную реакцию с супероксид-анионом. Образование пероксинитрита в значительной степени зависит от редокс-состояния клетки, которое определяется соотношением восстановленных и окис-

ленных форм соединений: восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона; НАДН и НАД⁺; НАДФН и НАДФ⁺. Schafer F. и Buettner G. полагают, что редокс-потенциал сопряженных окислительно-восстановительных реакций, протекающих в клетке, в соответствии с уравнением Нернста определяется восстанавливающей способностью субстратов этих редокс-пар и величиной половинного восстановительного потенциала клетки. Половинный восстановительный потенциал клетки в значительной мере зависит от концентрации в ней восстановленного глутатиона [19]. В проведенных исследованиях у крыс 1 группы отмечалось снижение активности Г6ФДГ на 46% ($p < 0,05$), а также содержания восстановленного глутатиона 44,2% ($p < 0,05$) на 2 сутки перитонита.

Таблица 2

Влияние НИЛИ, комплекса ЯК с 5-окси-6-метилурацилом и их комбинированного применения на показатели перекисного окисления липидов, антиоксидантной защиты в печени и содержание стабильных метаболитов оксида азота в плазме крови и моче у крыс при перитоните ($M \pm m$)

Исследуемый показатель	Интактные животные ($n = 6$)	Группы животных ($n = 18$ в группе)	Значение показателей на этапах исследования (от момента моделирования)		
			1-е сутки	3-е сутки	5-е сутки
ДК, ($\lambda = 232$) усл.ед. на 1 г ткани	$1,9 \pm 0,18$	2-я группа 3-я группа 4-я группа 5-я группа	$3,71 \pm 0,15^*$ $3,82 \pm 0,19^*$ $3,63 \pm 0,12^*$ $3,72 \pm 0,14^*$	$2,95 \pm 0,12^*$ $2,83 \pm 0,21^*$ $3,04 \pm 0,14^*$ $2,45 \pm 0,11^{*\wedge}$	$3,32 \pm 0,19^*$ $2,72 \pm 0,18^{*\wedge}$ $2,56 \pm 0,13^{*\wedge}$ $2,21 \pm 0,15^\wedge$
ИДС, ($\lambda = 220$) усл.ед. на 1 г ткани	$6,4 \pm 0,2$	2-я группа 3-я группа 4-я группа 5-я группа	$8,72 \pm 0,65^*$ $9,09 \pm 0,57^*$ $8,93 \pm 0,82^*$ $9,67 \pm 0,75^*$	$8,15 \pm 0,73^*$ $7,36 \pm 0,64$ $7,27 \pm 0,55$ $6,86 \pm 0,43$	$8,42 \pm 0,64^*$ $6,83 \pm 0,43$ $6,86 \pm 0,52$ $6,63 \pm 0,41^\wedge$
МДА мкмоль на 1 г ткани	281 ± 14	2-я группа 3-я группа 4-я группа 5-я группа	$535,3 \pm 23,1^*$ $531,3 \pm 19,3^*$ $548,8 \pm 31,2^*$ $391,0 \pm 24,3^{*\wedge}$	$449,4 \pm 27,8^*$ $355,5 \pm 15,2^{*\wedge}$ $402,5 \pm 17,8^*$ $345,3 \pm 21,4^{*\wedge}$	$577,7 \pm 25,4^*$ $439,8 \pm 17,2^{*\wedge}$ $317,0 \pm 21,1^\wedge$ $315,5 \pm 13,3^\wedge$
СОД, усл.ед. на 1 мг белка	$41,1 \pm 2,5$	2-я группа 3-я группа 4-я группа 5-я группа	$48,2 \pm 2,9$ $53,4 \pm 1,8^*$ $43,9 \pm 2,3$ $44,3 \pm 1,9$	$50,8 \pm 2,5^*$ $52,2 \pm 1,3^*$ $38,1 \pm 1,7^\wedge$ $39,8 \pm 2,6^\wedge$	$31,7 \pm 2,6^*$ $53,8 \pm 1,5^{*\wedge}$ $39,4 \pm 1,4^\wedge$ $42,6 \pm 2,7^\wedge$
Каталаза, мМоль в мин на 1 мг белка	$214,8 \pm 6,2$	2-я группа 3-я группа 4-я группа 5-я группа	$181,3 \pm 9,6^*$ $178,6 \pm 11,2^*$ $181,9 \pm 7,1^*$ $185,1 \pm 8,6^*$	$174,5 \pm 12,2^*$ $256,8 \pm 9,3^{*\wedge}$ $190,3 \pm 6,4^*$ $234,6 \pm 7,8^\wedge$	$153,7 \pm 5,1^*$ $210,7 \pm 7,5^\wedge$ $174,7 \pm 8,2^*$ $219,7 \pm 9,1^\wedge$
Г6ФДГ, нМоль в мин на мг белка	$54,6 \pm 1,6$	2-я группа 3-я группа 4-я группа 5-я группа	$49,1 \pm 1,7^*$ $56,9 \pm 1,9^\wedge$ $48,7 \pm 1,3^*$ $52,1 \pm 2,1$	$52,2 \pm 2,2$ $48,2 \pm 1,4^*$ $52,3 \pm 1,1$ $63,5 \pm 1,9^{*\wedge}$	$37,1 \pm 1,4^*$ $41,6 \pm 1,3^*$ $57,2 \pm 2,3^\wedge$ $70,9 \pm 2,7^{*\wedge}$
Восстановленный глутатион, мг %	$149 \pm 5,3$	2-я группа 3-я группа 4-я группа 5-я группа	$133,9 \pm 6,2$ $143,2 \pm 5,6$ $139,1 \pm 6,9$ $139,7 \pm 6,1$	$129,1 \pm 9,7$ $134,1 \pm 4,7$ $165,8 \pm 3,3^{*\wedge}$ $196,7 \pm 5,3^{*\wedge}$	$106,8 \pm 7,3^*$ $115,9 \pm 5,5^*$ $155,7 \pm 4,7^\wedge$ $181,8 \pm 7,1^{*\wedge}$
Церулоплазмин, мг %	$11,9 \pm 0,07$	2-я группа 3-я группа 4-я группа 5-я группа	$13,7 \pm 0,4^*$ $12,8 \pm 0,3^*$ $14,5 \pm 0,7^*$ $14,3 \pm 0,4^*$	$9,7 \pm 0,6^*$ $10,4 \pm 0,5^*$ $13,7 \pm 0,5^{*\wedge}$ $12,2 \pm 0,4^\wedge$	$8,6 \pm 0,5^*$ $9,5 \pm 0,4^*$ $13,3 \pm 0,3^{*\wedge}$ $12,7 \pm 0,3^\wedge$
Коэффициент МДА/ДК	$147,9 \pm 4,4$	2-я группа 3-я группа 4-я группа 5-я группа	$144,3 \pm 6,4$ $139,1 \pm 3,3$ $151,2 \pm 4,2$ $105,1 \pm 3,4^{*\wedge}$	$152,3 \pm 5,5$ $125,6 \pm 6,1^{*\wedge}$ $132,4 \pm 5,1^\wedge$ $140,9 \pm 5,7$	$174,0 \pm 4,9^*$ $161,7 \pm 5,8$ $123,8 \pm 6,1^{*\wedge}$ $142,8 \pm 4,3^\wedge$
Коэффициент ПОЛ/АОС	$1,0 \pm 0,1$	2-я группа 3-я группа 4-я группа 5-я группа	$5,29 \pm 0,42^*$ $5,33 \pm 0,31^*$ $4,62 \pm 0,27^*$ $3,16 \pm 0,13^{*\wedge}$	$4,4 \pm 0,61^*$ $3,14 \pm 0,42^*$ $2,59 \pm 0,22^{*\wedge}$ $1,47 \pm 0,12^{*\wedge}$	$9,3 \pm 1,12^*$ $5,0 \pm 0,61^{*\wedge}$ $1,66 \pm 0,13^{*\wedge}$ $1,03 \pm 0,11^\wedge$
Содержание UNO_x в плазме крови, мкмоль/л	$17,6 \pm 0,4$	2-я группа 3-я группа 4-я группа 5-я группа	$95,3 \pm 5,5^*$ $77,4 \pm 4,2^{*\wedge}$ $83,7 \pm 5,9^*$ $55,3 \pm 3,9^{*\wedge}$	$49,3 \pm 4,1^*$ $41,6 \pm 3,2^*$ $34,1 \pm 1,9^{*\wedge}$ $43,6 \pm 2,1^*$	$65,7 \pm 4,8^*$ $36,5 \pm 2,5^{*\wedge}$ $29,7 \pm 1,9^{*\wedge}$ $24,8 \pm 1,6^{*\wedge}$
Содержание UNO_x в моче, мкмоль/12 часов	$88,9 \pm 6,5$	2-я группа 3-я группа 4-я группа 5-я группа	$127,4 \pm 10,1^*$ $139,7 \pm 8,6^*$ $143,5 \pm 10,9^*$ $155,1 \pm 11,3^*$	$195,7 \pm 13,4^*$ $238,9 \pm 9,1^{*\wedge}$ $192,1 \pm 8,6^*$ $270,7 \pm 9,3^{*\wedge}$	$93,5 \pm 12,7$ $290,7 \pm 13,1^{*\wedge}$ $171,9 \pm 7,5^{*\wedge}$ $163,8 \pm 7,4^{*\wedge}$

Примечание: * – различие достоверно ($p < 0,05$) по сравнению с интактными животными.

^ – различие достоверно ($p < 0,05$) по сравнению со 2-й группой на определенные сутки эксперимента

У крыс 2-й группы, как следует из данных табл. 2, проведенная лечебная санация брюшной полости значительно не изменила содержание оксида азота в плазме крови и моче, однако позволила уменьшить выраженность окислительного стресса. Накопление продуктов ПОЛ было наименьшим на 3 сутки развития перитонита. Проведенные исследования установили повышение активности СОД в печени в 1-е и 3-и сутки на 17,3% ($p > 0,05$) и 23,6% ($p < 0,05$) соответственно, что свидетельствует о мобилизации защитно-приспособительных механизмов, связанных с избыточной продукцией супероксидного аниона-радикала. Избыточная активность СОД ведет к повышенному образованию перекиси водорода. При этом, по нашим данным, не происходит параллельного увеличения активности каталазы, что может быть связано с повышенной концентрацией водородных ионов, приводящих к возникновению протонированных форм ферментов, обладающих измененной каталитической активностью.

В то же время на 5 сутки на фоне сохраняющегося высокого уровня продуктов ПОЛ активность мембраносвязанной СОД, ключевого компонента антиоксидантной защиты, снижалась на 22,9% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем и на 37,6% ($p < 0,05$) по сравнению с данными 3-х суток. Торможение активности СОД во многом связано с избытком перекиси водорода, накапливающимся к 5 суткам вследствие сохраняющегося дефекта каталазы и снижения активности глутатионового звена антиоксидантной защиты. В эти же сроки снижалась активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) на 32,1% ($p < 0,05$) и содержание восстановленного глутатиона на 28,3% ($p < 0,05$). Глутатион участвует как в индуцированной глутатионпероксидазной реакции, так и в поддержании восстановленного состояния сульфгидрильных групп белковых молекул, редокс-статуса аскорбата и клетки в целом. Соотношение окисленных и восстановленных форм глутатионовой системы зависит от скорости реакции пентозного цикла, ключевым ферментом которого является Г6ФДГ. Выявленные изменения со стороны глутатионопосредованной детоксикации значительно снижает резистентность клеток к цитоповреждающему действию продуктов ПОЛ, свободных радикалов. Содержание церулоплазмينا, составляющего важную часть неспецифической защиты организма, остается сниженным во все сроки наблюдения. Динамика коэффициента МДА/ДК свидетельствует о постепенно нарастающем переходе первичных продуктов

ПОЛ в промежуточные и конечные. Следовательно, у 2-й группы животных на фоне проведенной лечебной санации брюшной полости продолжают окислительные процессы при истощении систем антиоксидантной защиты, что подтверждается сохраняющимся дисбалансом в системе ПОЛ-АОС. Развивающийся окислительный и нитролизующий стресс являются одним из основных механизмов повреждения биологических мембран.

В 3-й экспериментальной группе при дополнительном включении в терапию перитонита НИЛИ по сравнению с данными 2-й группы наблюдалось повышение активности каталазы и СОД, наиболее выраженное на 3-и сутки, что может быть связано со способностью НИЛИ активировать, ингибированную в условиях кислых рН супероксиддисмутазу за счет фотоиндуцированного депротонирования и последующего восстановления активного центра фермента. Важную роль в адсорбции излучения играет гемсодержащий фермент каталаза, где происходит структурная перестройка, ведущая к активации фермента [4]. Повышение активности антиоксидантных ферментов уменьшает содержание продуктов ПОЛ в ткани печени. Диеновые конъюгаты максимально накапливаются лишь в 1 сутки. Отмечается меньшее падение содержания ЦП. Коэффициент ПОЛ/АОС на 5-е сутки составил 5,0 ($p < 0,05$), что свидетельствует о снижении окислительного стресса.

Динамика изменения содержания оксида азота у крыс 3-й группы характеризовалась высоким содержанием суммы его стабильных метаболитов (NO_2 , NO_3) в плазме крови. Лишь на 3 и 5 сутки после проведения курса лазеротерапии концентрация UNO_x начинает несколько снижаться, но продолжает оставаться выше, чем у контрольных животных соответственно в 2,36 ($p < 0,05$) и 2,1 раза ($p < 0,05$). Особый интерес вызывают данные, полученные при динамическом исследовании концентрации конечных продуктов оксида азота в моче. У крыс первой группы в первые сутки содержание UNO_x лишь незначительно превышали контрольные показатели. Как показывают данные табл. 2, повышение стабильных метаболитов оксида азота в моче у крыс 3-й группы отмечается на 3 сутки, достигая максимальных значений к 5 суткам, увеличиваясь в 3,27 раза ($p < 0,05$). Многократное повышение нитратов в моче свидетельствует о том, что кровь активно очищается от конечных метаболитов оксида азота.

На 3-и сутки происходило снижение величины соотношения МДА/ДК в 1,17 раза ($p < 0,05$), что, по всей вероятности,

свидетельствует об адаптивном повышении функциональной мощности антиоксидантной системы, обуславливающей меньшую интенсивность превращения первичных в более токсичные промежуточные и конечные продукты ПОЛ. Однако к 5 суткам величина соотношения МДА/ДК увеличивается на фоне снижения первичных продуктов ПОЛ, что свидетельствует о возрастании интенсивности перехода первичных продуктов ПОЛ в промежуточные. Недостаточно выраженный эффект НИЛИ в данных условиях эксперимента выражается в сохраняющемся дефиците восстановленного глутатиона, что свидетельствует о неполной нормализации баланса про- и антиокислительной активности, связанной, по-видимому, с отсутствием запаса эндогенных антиоксидантов.

Терапия перитонита помимо специфических средств должна, по-видимому, включать препараты, ограничивающие активацию оксидантного стресса и оказывающие корригирующее влияние на метаболические процессы, компенсируя дефицит природных антиоксидантов. В этой связи несомненный интерес представляет комплексное соединение янтарной кислоты с 5-окси-6-метилурацилом. Ранее проведенные нами исследования установили, что данное соединение является ингибитором свободно-радикального окисления, уменьшает образование супероксидного анион-радикала, а также обладает противогипоксической активностью, ограничивая развитие метаболического ацидоза [11, 14]. Комплекс ЯК с 5-окси-6-метилурацилом, примененный в 4-й экспериментальной группе в режиме сопроводительной коррекции, ограничивал развитие окислительного стресса. В частности, отмечалось статистически значимое уменьшение содержания продуктов ПОЛ в ткани печени в сравнении с животными I группы, повышалось содержание церулоплазмينا, в меньшей степени активность каталазы, нормализовалась активность СОД, а также в отличие от НИЛИ восполнялся дефицит восстановленного глутатиона. Восстановленный глутатион является сквенджером активных форм азота, в частности, оксида азота и пероксинитрита, образуя с ними комплексы S-нитрозотиолы, являющиеся одной из депонированных форм оксида азота [18]. Поэтому при окислительном стрессе доступность оксида азота для быстрого взаимодействия с ним супероксид-аниона уменьшается, что существенно снижает вероятность образования пероксинитрита. Исследование показало, что комплексное соединение янтарной кислоты с 5-окси-

6-метилурацилом снижает концентрацию в плазме крови конечных продуктов оксида азота, а повышение нитратов в моче выражено в меньшей степени, чем у крыс, получавших курс лазеротерапии, что может свидетельствовать о депонировании оксида азота. Динамика коэффициента ПОЛ/АОС и величины соотношения МДА/ДК свидетельствуют о снижении окислительного стресса. При этом отклонения показателей от нормы были менее выраженными на конечных этапах наблюдения.

При применении комбинированной терапии у животных 5-й группы отмечается наиболее мощный лечебный эффект. Снижение содержания продуктов ПОЛ в печени, повышение активности СОД, каталазы, Г6ФДГ, содержания восстановленного глутатиона, церулоплазмина проявляются раньше и выражены в большей степени. Нормализация баланса в системе ПОЛ-АОС, величины соотношения МДА/ДК к 5 суткам эксперимента свидетельствуют о коррекции окислительного стресса. Кроме того, совместное применение НИЛИ и комплексного соединения янтарной кислоты с 5-окси-6-метилурацилом снижает выраженность нитрозирующего стресса, уменьшая содержание стабильных метаболитов оксида азота в плазме крови и увеличивая их выделение с мочой. Раннее и стабильное повышение уровня активности супероксиддисмутазы, нормализация содержания восстановленного глутатиона уменьшает образование пероксинитрита за счет снижения концентрации супероксид-аниона в реакции дисмутации, а также за счет нейтрализации активных форм азота.

Заключение

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют об усилении окислительных процессов, что при недостаточности системы антиоксидантной защиты ведет к развитию «окислительного и нитрозирующего стресса», являющегося одним из основных механизмов повреждения биологических мембран гепатоцитов при перитоните. Лечебная санация брюшной полости не обеспечивает в полной мере коррекцию возникших нарушений. Включение в терапию перитонита НИЛИ и комплекса ЯК с 5-окси-6-метилурацилом оказывает гепатопротекторное действие, влияя на нарушенное прооксидантно-антиоксидантное равновесие и стабилизируя биологические мембраны раньше и в большей степени, чем их раздельное применение, что в целом способствует поддержанию функциональной устойчивости гепатоцитов и повышает их адаптационные возможности при перитоните.

Список литературы

1. Алешина М.Ф. Низкоинтенсивное лазерное излучение в терапии социально значимых заболеваний внутренних органов / М.Ф. Алешина, Л.В. Васильев, И.А. Гончарова, В.А. Никитин // Вестник новых медицинских технологий. – 2010. – Т. XVII, № 2. – С. 90–91.
2. Бурдуин Н.М. Влияние лазерного излучения на микроциркуляцию, агрегацию тромбоцитов и эритроцитов крови больных ишемической болезнью сердца с сопутствующим сахарным диабетом 2 типа / Н.М. Бурдуин, А.Ю. Ке-хоева // Вестник новых медицинских технологий. – 2010. – Т. XVII, № 3. – С. 29–30.
3. Васильев И.Т. Антигипоксическая терапия перитонита / И.Т. Васильев, Р.Б. Мумидзе, С.М. Гудных // Анналы хирургии. – 2000. – № 4. – С. 33–38.
4. Владимиров, Ю.А. Три гипотезы о механизме действия лазерного излучения на клетки и организм человека // Эфферентная медицина. – М.: ИБМХ РАМН, 1994. – С. 51–67.
5. Волчегорский И.А. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови / И.А. Волчегорский, А.Г. Налимов, Б.Г. Яровинский, Р.И. Лифшиц // Вопросы медицинской химии. – 1989. – № 1. – С. 127–130.
6. Голиков П.П. Оксид азота и перекисное окисление липидов как факторы эндогенной интоксикации при неотложных состояниях / П.П. Голиков, Н.Ю. Николаева, И.А. Гавриленко [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2000. – № 2. – С. 6–9.
7. Королюк М.А. Метод определения активности ката-лазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–18.
8. Лаберко Л.А. Коррекция проявлений синдрома эн-теральной недостаточности при распространенном перито-ните / Л.А. Лаберко, И.А. Кузнецов, Л.С. Аронов [и др.] // Хирургия. – 2004. – № 9. – С. 25–28.
9. Метельская В.А. Скрининг-метод определения уров-ня метаболитов оксида азота в сыворотке крови / В.А. Ме-тельская, Н.Г. Гуманова // Клиническая лабораторная диа-гностика. – 2005. – № 6. – С. 15–18.
10. Москвин С.В. Эффективность лазерной терапии / С.В. Москвин. – М.: ИПЛЦ «Техника», 2003. – 254 с.
11. Мышкин В.А. Эффективность пиримидиново, сукци-натипиримидиново комплексов и некоторых лекарствен-ных средств при острой гемической гипоксии (метгемогло-бинемии) / В.А. Мышкин, Д.В. Срубиллин, Р.Б. Ибатуллина, А.И. Савлуков, Д.А. Еникеев // Медицинский Вестник Баш-кортостана. – 2008. – № 2. – С. 56–58.
12. Петросян Э.А. Продукция оксида азота тромбоцитами при экспериментальном желчном перитоните / Э.А. Петросян, А.А. Боташев, О.А. Терешенко [и др.] // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2010. – № 10. – С. 64–66.
13. Рууге Э.К. Митохондриальные болезни: современ-ные концепции // Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека: в сб. – Смоленск, 2005. – С. 150–151.
14. Срубиллин Д.В. Антирадикальная и антиокси-дантная активность комплексного соединения 5-окси-6-мети-лурацила с янтарной кислотой и его эффективность при гипоксических состояниях / Д.В. Срубиллин, Д.А. Ени-кеев, В.А. Мышкин // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 6. – С. 166–170.
15. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислитель-ных процессах клетки и метод определения ее в биологиче-ских материалах / С. Чевари, Н. Чаба, Й. Секей // Лаборатор-ное дело. – 1985. – № 11. – С. 678–680.
16. Glock G. Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver / G. Glock, P. McLean // Biochem. – 1953. – Vol. 55, № 3. – P. 400–408.
17. Glurgea N. Ceruloplasmin – acute phase reactant or endogenous antioxidant? The case of cardiovascular disease / N. Glurgea, M.I. Constantinescu, R. Stanciu [et al] // Med. Sci. Monit. – 2005. – № 11. – P. 48–51.
18. Price D.T. Redox control of vascular nitric oxide bioavailability / D.T. Price, J.A. Vita, J. F. Keane // Antioxid. Redox Signall. – 2000. – Vol. 2, N 4. – P. 919–935.
19. Schafer F.Q. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple / F. Q. Schafer, G. R. Buettner // Free Radic. Biol. Med. – 2001. – Vol. 30, N 11. – P. 1191–1212.

References

1. Aleshina M.F., Vasil'ev L.V., Goncharova I.A., Niki-тин V.A. Nizkointensivnoe lazernoe izluchenie v terapii social'no

znachimyh zabolevanij vnutrennih organov // *Vestnik novyh medicinskih tehnologij*. 2010. Vol. VII, no. 2. pp. 90–91.

2. Burduin N.M., Kehoeva A.Ju. Vlijanie lazernogo izlucheniya na mikrocirkuljaciju, agregaciju trombocitov i jeritrocitov krvi bol'nyh ishemicheskoj bolezni'ju serdca s sopushtstvjushhim saharnym diabetom 2 tipa // *Vestnik novyh medicinskih tehnologij*. 2010. Vol. XVII, no 3. pp. 29–30.
3. Vasil'ev I.T., Mumidze R.B., Gudnyh S.M. Antigipoksicheskaja terapija peritonita // *Annaly hirurgii*. 2000. no. 4. pp. 33–38.
4. Vladimirov, Ju.A. Tri gipotezy o mehanizme dejstvija lazernogo izlucheniya na kletki i organizm cheloveka // *Jefferentnaja medicina*. M.: IBMH RAMN. 1994. pp. 51–67.
5. Volchegorskij I.A., Nalimov A.G., Jarovinskij B.G., Lifshic R.I. Sopotavlenie razlichnyh podhodov k opredeleniju produktov perekisnogo okislenija lipidov v geptan-izopropanol'nyh jekstraktah krvi // *Voprosy medicinskoj himii*. 1989. no. 1. pp. 127–130.
6. Golikov P.P., Nikolaeva N.Ju., Gavrilenko I.A., Matveev S.B., Davydov B.V., Marchenko V.V., Smirnov S.V., Lebedev V.V., Golikov A.P. Oksid azota i perekisnoe okislenie lipidov kak faktory jendogennoj intoksikacii pri neotlozhnyh sostojanijah // *Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja terapija*. 2000. no. 2. pp. 6-9.
7. Koroljuk M.A., Ivanova L.I., Majorova I.G. Metod opredelenija aktivnosti katalazy // *Lab. Delo*. 1988. no 1. pp. 16-18.
8. Laberko L.A., Kuznecov I.A., Aronov L.S. Korrekciya projavlenij sindroma jenteral'noj nedostatochnosti pri rasprostranennom peritonite // *Hirurgija*. 2004. no. 9. pp. 25–28.
9. Metel'skaja V.A., Gumanova N.G. Skrininng-metod opredelenija urovnja metabolitov oksida azota v syvorotke krvi // *Klinicheskaja laboratornaja diagnostika*. 2005. no. 6. pp. 15–18.
10. Moskvina S.V // *Jefferektivnost' lazernoj terapii*. M., 2003. 254 p.
11. Myshkin V.A., Srubilin D.V., Ibatullina R.B., Savlu-kov A.I., Enikeev D.A. Jefferektivnost' pirimidinovo, sucin- ATPirimidinovyh kompleksov i nekotoryh lekarstvennyh sredstv pri ostroj gemicheskoj gipoksii (metgemoglobinemii) // *Medicinskij Vestnik Bashkortostana*. 2008. no. 2. pp. 56–58.
12. Petrosjan Je.A., Botashev A.A., Tereshhenko O.A., Lajpanov A.M., Ivanov V.V. Produkcija oksida azota trom- bocitami pri jeksperimental'nom zhelchnom peritonite // *Jeksperimental'naja i klinicheskaja gastrojenterologija*. 2010. no. 10. pp. 64–66.
13. Ruuge, Je.K. Mitochondrial'nye bolezni: sovremennye koncepcii // *V sb.: Aktivnye formy kisloroda, oksid azota, antioksidanty i zdorov'e cheloveka*. Smolensk. 2005. pp. 150–151.
14. Srubilin D.V., Enikeev D.A., Myshkin V.A. Antiradikal'naja i antioksidantnaja aktivnost' kompleksnogo soedinenija 5-oksi-6-metiluracila s jantarnoj kislotoj i ego jefferektivnost' pri gipoksicheskikh sostojanijah // *Fundamental'nye issledovanija*. 2011. no. 6. pp. 166–170.
15. Chevari S., Chaba N., Sekej J. Rol' superoksiddis- mutazy v okislitel'nyh processah kletki i metod opredelenija ee v biologicheskikh materialah // *Laboratornoe delo*. 1985. no. 11. pp. 678–680.
16. Glock G., McLean P. Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phos- phogluconate dehydrogenase of rat liver // *Biochem*. 1953. Vol. 55, no. 3. pp. 400–408.
17. Glurgea N., Constantinescu M.I., Stanciu R. Ceruloplas- min – acute phase reactant or endogenous antioxidant? The case of cardiovascular disease // *Med. Sci. Monit*. 2005. no. 11. pp. 48–51.
18. Price D. T., Vita J.A., Keane J. F. Redox control of vascular nitric oxide bioavailability // *Antioxid. Redox Signall*. 2000. Vol. 2, no. 4. pp. 919–935.
19. Schafer F.Q., Buettner G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple // *Free Radic. Biol. Med*. 2001. Vol. 30, no. 11. pp. 1191–1212.

Рецензенты:

Миннебаев М.М., д.м.н., профессор ка- федры патофизиологии, ГБОУ ВПО «Ка- занский государственный медицинский университет», г. Казань;

Фролов Б.А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой патофизиологии, ГБОУ ВПО «Оренбургская государственная медицин- ская академия», г. Оренбург.

Работа поступила в редакцию 16.12.2013.