

УДК 577.1:616.127-008.9

**ВОЗДЕЙСТВИЕ ДОНОРА ОКСИДА АЗОТА (II) L-АРГИНИНА НА АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ОКСИДОРЕДУКТАЗ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ТКАНИ СЕРДЦА КРЫС В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА ОКСИДА АЗОТА**

**Звягина В.И., Медведев Д.В., Бельских Э.С., Фрольцов Д.В.**

*ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Рязань, e-mail: vizvyagina@yandex.ru*

Целью работы было изучить влияние донора NO L-аргинина на содержание метаболитов оксида азота, активность оксидоредуктаз митохондрий и процессы спонтанного окисления белков в ткани сердца крыс в условиях ингибирования синтеза NO, вызванного неселективным ингибитором NO-синтазы L-N<sup>o</sup>-нитроаргинина метиловым эфиром (L-NAME), и оценить действие L-аргинина на функциональное состояние митохондрий клеток сердца. Для выделения митохондрий использовался метод дифференциального центрифугирования. Концентрацию метаболитов NO и активность ферментов измеряли спектрофотометрически, окислительную модификацию белков оценивали по методу R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой. В ходе исследования выявлено, что ингибирование синтеза NO под действием L-NAME приводит к статистически значимым изменениям активности ферментов митохондрий и развитию вторичной митохондриальной дисфункции. L-аргинин стимулирует образование метаболитов NO в сыворотке крови и ещё более выражено в митохондриях ткани сердца крыс в условиях дефицита NO. Действие L-аргинина на метаболизм клеток сердца крыс можно в целом оценить как положительное, так как он замедляет процессы свободно-радикального окисления белков в цитоплазме этих клеток и нормализует активность большинства ферментов митохондрий, способствуя компенсации митохондриальной дисфункции.

**Ключевые слова:** оксид азота, вторичная митохондриальная дисфункция, L-аргинин, L-NAME

**EFFECTS OF NITRIC OXIDE (II) DONOR L-ARGININE ON THE ACTIVITY OF MITOCHONDRIAL OXIDOREDUCTASES AND OXIDATIVE PROCESSES IN RAT HEART TISSUE IN CONDITIONS OF NITRIC OXIDE DEFICIT**

**Zvyagina V.I., Medvedev D.V., Belskikh E.S., Froltsov D.V.**

*Ryazan state medical university, Ryazan, e-mail: vizvyagina@yandex.ru*

The aim was to study the effect of donor NO L-arginine to nitric oxide content, the activity of mitochondrial oxidoreductases and processes of spontaneous oxidation of proteins in heart tissue of rats in inhibiting the synthesis of NO, caused by non-selective NO-synthase inhibitor, L-N<sup>o</sup>-nitroarginine methyl ester (L-NAME), and to evaluate the effect of L-arginine on the functional state of the heart cells mitochondria. To isolate mitochondria the method of differential centrifugation was used. The concentration of NO metabolites and enzyme activity was measured spectrophotometrically, oxidative modification of proteins was evaluated by the method of R.L. Levine in modification of E.E. Dubinina. The study showed that the inhibition of NO synthesis by the action of L-NAME results in statistically significant changes of enzyme activity of mitochondria and in development of secondary mitochondrial dysfunction. L-arginine promotes the formation of NO metabolites in blood serum and more pronounced in the mitochondria of the cardiac tissue of rats in a shortage of NO. Effect of L-arginine on metabolism of the rat heart cells can be evaluated as a whole is positive, since it slows down the free radical oxidation of proteins in the cytoplasm of these cells and normalizes the activity of the majority of the mitochondrial enzymes, contributing to compensation of mitochondrial dysfunction.

**Keywords:** nitric oxide, the secondary mitochondrial dysfunction, L-arginine, L-NAME

Большинство заболеваний сердца связано с ишемией миокарда. Одной из причин ишемии может являться дефицит оксида азота (NO). Недостаточное кровоснабжение сердца вызывает метаболические нарушения в кардиомиоцитах, что, в свою очередь, приводит к развитию вторичной митохондриальной дисфункции. Митохондриальная дисфункция представляет собой патологический процесс, который может быть вызван различными повреждающими факторами, в частности, ишемией. Выделяют первичную митохондриальную дисфункцию, являющуюся следствием врождённого генетического дефекта, и вторичную, возникающую при некоторых при-

обретённых заболеваниях [2]. Вторичная митохондриальная дисфункция включается в патогенез хронической сердечной недостаточности и острого коронарного синдрома [2, 13]. Дисфункция митохондрий приводит к нарушению окислительного декарбоксилирования пирувата, окисления ацетил-КоА, окислительного фосфорилирования, β-окисления жирных кислот, непрямого окислительного дезаминирования аминокислот, системы антиоксидантной защиты и гиперпродукции митохондриями активных форм кислорода.

В свете вышесказанного целесообразным является поиск средств метаболической коррекции вторичной дисфункции

митохондрий при заболеваниях сердца в условиях дефицита NO. Одним из возможных соединений, улучшающих метаболизм кардиомиоцитов при ишемии миокарда, является донор NO L-аргинин. На настоящий момент проведён ряд исследований, касающихся возможности применения аргинина в кардиологии [1]. Однако влияние этой аминокислоты на функционирование митохондрий кардиомиоцитов не изучалось.

**Цель исследования:** изучить влияние аргинина на содержание метаболитов NO, активность оксидоредуктаз митохондрий и процессы спонтанного окисления белков в ткани сердца крыс в условиях ингибирования синтеза NO, и, исходя из полученных данных, оценить действие аргинина на функциональное состояние митохондрий клеток сердца.

#### Материалы и методы исследования

Исследование проводилось на 40 крысах самцах линии Вистар массой 230–270 г. Крысы были разделены на 5 групп, каждая из которых включала по 8 животных. Первой группе ежедневно в течение 7 дней 1 раз в сутки внутривентриально вводился 0,9% раствор NaCl, второй и третьей группам ежедневно в течение 7 дней 1 раз в сутки внутривентриально вводился водный раствор L-N<sup>G</sup>-нитроаргинина метилового эфира (L-NAME) – неселективного ингибитора NO-синтазы в дозах 25 и 200 мг/кг соответственно, четвёртой и пятой группам на фоне ежедневного в течение 10 дней введения 1 раз в сутки per os раствора аргинина в дозе 500 мг/кг на 0,9% растворе NaCl внутривентриально вводился в течение 7 дней 1 раз в сутки водный раствор L-NAME в дозах 25 и 200 мг/кг соответственно. Выбор доз проводился на основе литературных данных [1, 7, 11, 14].

При работе с крысами руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Умерщвление животных проводилось под эфирным наркозом путём вскрытия брюшной полости и пересечения спинной аорты.

Сыворотку крови использовали для определения содержания в ней метаболитов NO. Из ткани сердца с помощью гомогенизатора Potter S получали гомогенат и выделяли из него митохондрии методом дифференциального центрифугирования [10]. Для оценки окислительной модификации белков использовали надосадочную жидкость, а осадок, содержащий митохондрии, ресуспендировали в 0,25 М растворе сахарозы с добавлением детергента Тритона X-100 (для разрушения митохондриальных мембран) и далее использовали для определения активности митохондриальных ферментов: сукцинатдегидрогеназы, митохондриальной Mn-зависимой супероксиддисмутазы, α-гидроксибутиратдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы, а также для измерения концентрации метаболитов NO в митохондриях.

Общее содержание белка в пробах определяли по методу Лоури с помощью стандартизованного набора DiaSyS Diagnostic Systems. Окислительную модификацию белков оценивали с помощью метода R.L. Levine [12] в модификации Е.Е. Дубининой [5], основанного на реакции взаимодействия карбо-

нильных групп и иминогрупп окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, обладающих специфическим спектром поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях спектра. Оптическую плотность образовавшихся динитрофенилгидразонов регистрировали на спектрофотометре СФ-2000 при длинах волн 254, 270, 280, 356, 363, 370, 430 и 530 нм.

Активность α-гидроксибутиратдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы измеряли с помощью стандартизованных наборов Dia SyS Diagnostic Systems.

Активность сукцинатдегидрогеназы исследовали с помощью метода, основанного на определении восстановленного гексацианоферрата [10]. Активность супероксиддисмутазы определяли при помощи метода В.А. Костюка [6].

Определение концентрации метаболитов NO (нитритов и нитратов) проводили с помощью метода в модификации В.А. Метельской [8] на иммуоферментном анализаторе StatFax 3200.

Полученные в ходе исследования результаты обрабатывались с помощью программы Microsoft Excel 2003. Для определения различий между независимыми группами использовали U-критерий Манна-Уитни. Уровень отличий рассматривался как статистически значимый при вероятности ошибки (p) < 0,05.

#### Результаты исследования и их обсуждение

Из таблицы 1 видно, что введение L-NAME вызывает дозозависимое снижение концентрации метаболитов NO и в сыворотке крови, и в митохондриях сердца. Менее выраженное снижение концентрации метаболитов NO в митохондриях сердца по сравнению с сывороткой крови может быть связано с особенностями распределения L-NAME в организме или с некоторой селективностью его действия в отношении конститутивных форм NO-синтаз [4]. Повидимому, L-NAME как ингибитор оказывает более выраженное действие на эндотелиальную NO-синтазу, являющуюся главным поставщиком NO для крови, чем на индуцибельную NO-синтазу, являющуюся главным продуцентом NO в митохондриях сердца (фермент экспрессируется в сердце как при патологии, так и в норме, и обладает в сотни раз большей активностью, чем конститутивные формы NO-синтаз [3]).

Аргинин при совместном введении с L-NAME в обеих дозах увеличивает концентрации метаболитов NO как в сыворотке крови, так и в митохондриях клеток сердца. Это косвенно указывает на способность аргинина активировать синтез NO даже при ингибировании NO-синтаз.

Применение L-NAME приводит к снижению активности α-гидроксибутиратдегидрогеназы, практически не зависящему от дозы ингибитора NO-синтазы. Введение аргинина не вызывает достоверного изменения активности фермента на

фоне L-NAME в дозе 25 мг/кг, но приводит к резкому (в 4,3 раза) увеличению активности  $\alpha$ -гидроксibuтиратдегидрогеназы на фоне L-NAME в дозе 200 мг/кг.  $\alpha$ -гидроксibuтиратдегидрогеназной активностью обладают 2 изофермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ) – ЛДГ-1 и ЛДГ-2, так как только эти 2 изофермента ЛДГ способны катализировать обратимую реакцию превращения  $\alpha$ -гидроксibuтирата в 2-оксibuтират. В митохондриях клеток сердца в отличие от цитоплазмы кардиомиоцитов нет ЛДГ-2, а присутствует только ЛДГ-1 (и не измеряемая данным методом ЛДГ-5). Митохондри-

альная ЛДГ-1 связана с внешней стороной внутренней мембраны митохондрий, её активный центр обращён в матрикс. Этот фермент является составной частью митохондриального лактат-окисляющего комплекса, обеспечивающего дегидрирование лактата и одновременно транспорт образующегося пирувата в митохондрию [9]. Обратная реакция восстановления пирувата в лактат в митохондриях сердца малоактивна. Поэтому повышение активности  $\alpha$ -гидроксibuтиратдегидрогеназы митохондрий должно свидетельствовать об активации процесса окисления лактата.

Концентрация метаболитов NO, общий белок и показатели активности ферментов митохондрий (результаты представлены в форме: среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение, M  $\pm$  s)

	0,9%-й раствор NaCl в/б	L-NAME 25 мг/кг в/б	L-NAME 200 мг/кг в/б	L-NAME 25 мг/кг в/б + аргинин 500 мг/кг per os	L-NAME 200 мг/кг в/б + аргинин 500 мг/кг per os
Концентрация метаболитов NO в сыворотке крови, мкмоль/л	111,84 $\pm$ 9,09	74,62 $\pm$ 8,56* ( $\downarrow$ 33,28%)	31,73 $\pm$ 12,88* ( $\downarrow$ 71,63%)	89,69 $\pm$ 13,06** ( $\uparrow$ 16,3%)	49,16 $\pm$ 5,06** ( $\uparrow$ 35,2%)
Концентрация метаболитов NO в митохондриях клеток сердца, мкмоль/л	96,62 $\pm$ 19,33	77,98 $\pm$ 13,24* ( $\downarrow$ 19,2%)	52,82 $\pm$ 13,81* ( $\downarrow$ 45,33%)	108,66 $\pm$ 11,33** ( $\uparrow$ 28,4%)	105,13 $\pm$ 10,02** ( $\uparrow$ 49,1%)
Общий белок неседиментированной фракции, мг/мл	4,54 $\pm$ 1,12	3,86 $\pm$ 1,71	6,31 $\pm$ 1,02*	6,79 $\pm$ 1,10**	8,06 $\pm$ 0,55**
Общий белок митохондриальной фракции, мг/мл	4,44 $\pm$ 1,16	3,35 $\pm$ 0,74	4,98 $\pm$ 1,88	8,95 $\pm$ 1,05**	5,49 $\pm$ 2,47
Активность $\alpha$ -гидроксibuтиратдегидрогеназы, ЕД/г белка	63,07 $\pm$ 15,63	42,09 $\pm$ 9,55*	45,61 $\pm$ 13,69*	39,3 $\pm$ 3,63**	169,11 $\pm$ 42,47**
Активность глутаматдегидрогеназы, ЕД/г белка	9,38 $\pm$ 1,39	6,75 $\pm$ 1,99*	2,22 $\pm$ 0,94*	10,28 $\pm$ 1,77**	4,02 $\pm$ 0,45**
Активность сукцинатдегидрогеназы, нмоль сукцината/мин на г белка	18,17 $\pm$ 2,87	32,78 $\pm$ 5,91*	8,31 $\pm$ 2,16*	14,64 $\pm$ 5,07	15,12 $\pm$ 4,66
Активность супероксиддисмутазы, оптическая плотность, у.е./ мг белка	16,66 $\pm$ 7,29	83,51 $\pm$ 34,61*	69,95 $\pm$ 15,42*	10,37 $\pm$ 3,40**	6,57 $\pm$ 3,27**

Примечания :

\* – достоверные отличия от группы, получавшей 0,9%-й раствор NaCl (p < 0,05);

\*\* – достоверные отличия от групп, получавших L-NAME в соответствующих дозах (p < 0,05).

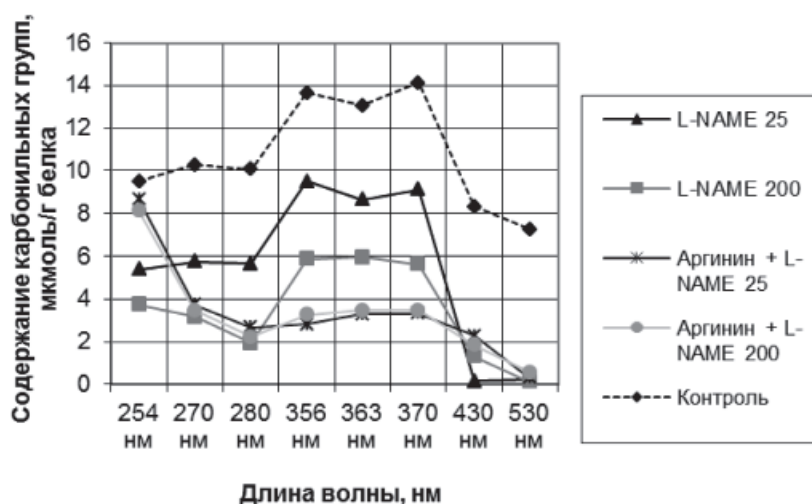
Активность глутаматдегидрогеназы под действием L-NAME достоверно дозозависимо снижается на 28,15% при дозе 25 мг/кг и на 76,46% при дозе 200 мг/кг. Введение аргинина на фоне L-NAME в дозе 25 мг/кг приводит к увеличению активности фермента более чем в 1,5 раза, а на фоне L-NAME в дозе 200 мг/кг – в 1,8 раз. Значительное увеличение активности глутаматдегидрогеназы под действием аргинина объясняется избыточным поступлением аминокислот в организм животного, что приводит к необходимости их утилизации путём непрямого окислительного дезаминирования.

Активность сукцинатдегидрогеназы под действием L-NAME изменяется разнонаправлено: доза 25 мг/кг приводит к достоверному увеличению активности фермента в 1,8 раза, а доза 200 мг/кг – к её снижению в 2,2 раза. Введение аргинина на фоне L-NAME в дозе 25 мг/кг приводит к снижению активности фермента в 2,2 раза, а на фоне L-NAME в дозе 200 мг/кг – к повышению его активности в 1,8 раз, но эти изменения не являются статистически значимыми. Интересно, что при использовании аргинина в обоих случаях активность сукцинатдегидрогеназы близка к значению

контрольной группы, то есть имеет место нормализация активности фермента под действием аргинина в условиях ингибирования синтеза NO.

Введение L-NAME в дозе 25 мг/кг приводит к увеличению активности супероксиддисмутазы более чем в 4 раза, а в дозе 200 мг/кг – в 3,2 раза. Аргинин вызывает резкое снижение активности фермента как на фоне L-NAME в дозе 25 мг/кг в 8 раз, так и на фоне L-NAME в дозе 200 мг/кг в 10,7 раза. Этот эффект аргинина, видимо, обусловлен его антиоксидантным действием.

Введение L-NAME в дозе 25 мг/кг достоверно ( $p < 0,05$  – по сравнению с контрольной группой) снижает показатели спонтанной ОМБ при длине волны 430 нм в 49,5 раз (рисунок). L-NAME же в дозе 200 мг/кг достоверно снижает значения спонтанной ОМБ при  $\lambda = 356$  нм на 38,2% ( $p < 0,01$  – по сравнению с контрольной группой), а при 363 нм – на 31,3% ( $p < 0,05$  – по сравнению с контрольной группой). Введение аргинина на фоне L-NAME в дозе 25 мг/кг снижает показатели спонтанной ОМБ при длинах волн 356 и 363 нм соответственно в 3,4 и 2,6 раз, а на фоне L-NAME в дозе 200 мг/кг – при длинах волн 356, 363 и 370 нм соответственно в 1,8, 1,7 и 1,6 раз ( $p < 0,05$  – по сравнению с группами, получавшими L-NAME в соответствующих дозах). Таким образом, аргинин снижает количество как ранних маркеров окислительной деструкции белков – нейтральных альдегиддинитрофенилгидразонов (их максимум поглощения 356 нм), так и поздних – нейтральных кетондинитрофенилгидразонов (максимумы поглощения 363 и 370 нм). Такая динамика указывает на непрямой антиоксидантный эффект аргинина, который, по-видимому, не связан с его действием на активность митохондриальных оксидоредуктаз.



Результаты спонтанной ОМБ: содержание карбонильных групп на 1 г белка в пробе

### Выводы

Ингибирование синтеза NO под действием L-NAME приводит к статистически значимым изменениям активности изучаемых ферментов митохондрий и развитию вторичной митохондриальной дисфункции.

Аргинин стимулирует образование метаболитов NO в сыворотке крови и ещё более выражено в митохондриях ткани сердца крыс в условиях ингибирования синтеза NO, вызванного L-NAME.

Действие аргинина на метаболизм клеток сердца крыс можно в целом оценить как положительное, потому что он замедляет процессы свободно-радикального окисления белков в цитоплазме этих клеток и нор-

мализует активность большинства ферментов митохондрий, способствуя компенсации митохондриальной дисфункции.

### Список литературы

1. Алмакаева Л.Г., Литвинова Е.В. Аргинин и его применение в медицине и фармации // Ліки України плюс. – 2011. – № 1 (5). – С. 23–26.
2. Вторичная митохондриальная дисфункция при остром коронарном синдроме / Ю.А. Васюк, К.Г. Куликов, О.Н. Кудряков [и др.] // Рациональная фармакотерапия в кардиологии, 2007. – № 1. – С. 41–47.
3. Гарматина О.Ю., Ткаченко М.Н., Мойбенко А.А. Индуцибельная синтаза оксида азота при патологии сердца (обзор литературы и собственных исследований) // Теоретична медицина. – 2005. – Т. 11. – № 4. – С. 645–660.
4. Граник В.Г., Григорьев Н.Б. Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств: монография. – М.: Вузовская книга. – 2004. – 360 с.

5. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров, Д.А. Ходов [и др.] // Вопросы мед. химии. – 1995. – Т. 41. – № 1. – С. 24–26.

6. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопросы мед. химии. – 1990. – № 2. – С. 88–91.

7. Марков Х.М. L-аргинин–оксид азота в терапии болезней сердца и сосудов // Кардиология. – 2005. – № 6. – С. 87–95.

8. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – № 6. – С. 15–18.

9. Мещерякова О.В., Чурова М.В., Немова Н.Н. Митохондриальный лактат-окисляющий комплекс и его значение для поддержания энергетического гомеостаза клеток (обзор) // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Т. 1. Экологическая физиология и биохимия водных организмов: сборник научных статей. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2010. – С. 163–172.

10. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / под ред. М.И. Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленинградского университета, 1982. – 327с.

11. Эндотелиопротекторные эффекты L-аргинина при моделировании дефицита окиси азота. / М.В. Покровский, Т.Г. Покровская, В.И. Корчаков [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2008. – Т.71, № 2. – С. 29–31.

12. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins / R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver [at al.] // Methods in enzymology. – 1990. – Vol. 186. – P. 464–478.

13. Marcovina Santica M., Sirtori Cesare, Peracino Andrea. Translating the basic knowledge of mitochondrial functions to metabolic therapy: role of L-carnitine // The journal of laboratory and clinical medicine. – 2012. – P. 73–84.

14. Zun-Yi Wang, Hakanson Rolf. Role of nitric oxide (NO) in ocular inflammation // British Journal of Pharmacology – 1995. – Vol. 116. – P. 244–245.

### References

1. Almakaeva L.G., Litvinova E.V. Liki Ukrainy plyus, 2011, no. 1, pp. 23–26.

2. Vasyuk Y.A., Kulikov K.G. Kudryakov O.N., Krikunova O.V., Sadulaeva I.A. Ratsionalnaya farmacoterapiya v cardiologii, 2007, no.1, pp. 41–47.

3. Garmatina O.Y. Tkachenko M.N., Moybenko A.A. Teoretichna medicina, 2005, vol. 11, no. 4, pp. 645–660.

4. Granik V.G., Grigorev N.B. Novyi put k poisku lekarstv. Vusovskaya kniga, 2004, 370 p.

5. Dubinina E.E. Burmistrov S.O., Chodov D.A., Porotov I.G. Voprosy meditsinskoj chimii, 1995, vol. 41, no. 1, pp. 24–26.

6. Kostyuk V.A., Potapovich A.I., Kovaleva Z.V. Voprosy meditsinskoj chimii, 1990, no. 2, pp. 88–91.

7. Markov C.M. Cardiologiya, 2005, no. 6, pp. 87–95.

8. Metelskaya V.A., Gumanova N.G. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika, 2005, no. 6, pp. 15–18.

9. Mescheryakova O.V., Churova M.V., Nemova N.N. Ekologicheskaya fiziologiya i biochimiya vodnykh organizmov, Petrozavodsk 2010, pp. 163–172.

10. Prokhorova M.I. Metody biokhimicheskikh issledovaniy (lipidniy i energeticheskiy obmen). Izdatelstvo Leningradskogo universiteta, 1982, 327 p.

11. Pokrovskiy M.V., Pokrovskaya T.G., Korchakov V.I., Artyushkova E.B. Eksperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya, 2008, vol. 71, no. 2, pp. 29–31.

12. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.-G., Ahn B.-W., Shaltiel S., Standtman E.R. Methods in enzymology, 1990, vol. 186, pp. 464–478.

13. Marcovina S. M., Sirtori C., Peracino A., Gheorgiade M., Borum P., Remuzzi G., Ardehali H. The journal of laboratory and clinical medicine, 2012, pp. 73–84.

14. Zun-Yi W., Hakanson R. British Journal of Pharmacology, 1995, vol. 116, pp. 244–245.

### Рецензенты:

Булатецкий С.В., д.м.н., профессор кафедры уголовного процесса и криминалистики, полковник полиции, Рязанский филиал ФГКОУ ВПО «Московский университет Министерства внутренних дел Российской Федерации», г. Рязань;

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.

Работа поступила в редакцию 15.07.2013.