

УДК 616.61-002.151; 612.086.2

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЧЕК И СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

¹Джиоев И.Г., ²Козаев А.В., ¹Гатагонова Т.М., ¹Хубулов И.Г., ³Клочков Д.А.

¹ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Владикавказ, e-mail: inal44@mail.ru;

²ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет
им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Санкт-Петербург, e-mail: andrei_kozhaev@mail.ru;

³Филиал № 3 ФГКУ «1602 Военно-клинический госпиталь» Министерства обороны
Российской Федерации, Владикавказ

Поражения почек различного генеза способны привести не только к нарушению их функции, но и вызвать изменения, несовместимые с жизнью. Целью настоящей работы было изучение функционально-морфологического состояния почек, перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в условиях острого токсического поражения почек, которое создавалось по G. Greven на крысах линии Вистар путем внутримышечного введения 50,0% глицерина в дозе 0,8 мл/100 г и последующего трехкратного исследования в течение двух недель, когда наблюдалось снижение спонтанного диуреза вследствие торможения скорости клубочковой фильтрации, вызванного уменьшением объемной скорости почечного кровотока. Одновременно отмечались протеинурия, натриурез, который был обусловлен снижением канальцевой реабсорбции натрия, увеличение уровня креатинина в плазме крови, усиление окислительной дегградации липидов с повышением содержание гидроперекисей и малонового диальдегида и снижением антиоксидантной защиты по активности супероксиддисмутазы и каталазы. А в почках наблюдалась экссудативная гломерулопатия, острый канальцевый некроз и интерстициальный нефрит с застойно-геморрагическими элементами.

Ключевые слова: спонтанный диурез, фильтрация, реабсорбция, почечный кровоток, протеинурия, натриурез, каталаза, малоновый диальдегид, супероксиддисмутазы, гидроперекиси, интерстициальный нефрит

FUNCTIONAL AND MORPHOLOGICAL FEATURES OF KIDNEYS AND CONDITION OF ANTIOXIDANT SYSTEM WITH EXPERIMENTAL RAPID KIDNEY INSUFFICIENCY

¹Dzhioev I.G., ²Kozhaev A.V., ¹Gatagonova T.M., ¹Hubulov I.G., ³Klochkov D.A.

¹North Ossetian State Medical Academy, Vladikavkaz, e-mail: inal44@mail.ru;

²North Western State Medical University of I.I. Mechnikov, St. Petersburg,
e-mail: andrei_kozhaev@mail.ru;

³Branch № 3 of Federal public commercial institution «1602 Military
and clinical hospital» Ministries of Defence of Russia, Vladikavkaz

Affection of kidneys of various genesis are capable to lead not only to dysfunctional condition, but also to cause changes incompatible with life. The purpose of the real work was studying functional and morphological a condition of kidneys, peroxidation of lipids and antioxidant protection in the conditions of sharp toxic affection of kidneys which was created on G. Greven on rats of the line Wistar by intramuscular introduction of 50,0% of glycerin in a dose of 0,8 ml/100 g and the subsequent triple research within two weeks when it was observed decrease of spontaneous diuresis owing to braking of speed of the glomerular filtration, caused by reduction of volume speed of a kidney blood flow was observed. They were noted proteinuria and increase in an excretion of sodium at the same time which was caused by decrease in a tubular reabsorption of sodium, increase in level of creatinine in blood plasma, strengthening of oxidizing degradation of lipids with increase of the content of hydroperoxides and malonic dialdehyde and decrease in antioxidant protection on activity superoxide dismutase and catalase. And in kidneys were observed the glomerulopathy, a sharp tubular necrosis and interstition nephrite with stagnant and hemorrhagic elements.

Keywords: spontaneous diuresis, filtration, reabsorption, kidney blood flow, proteinuria, sodium excretion, catalase, malonic dialdehyde, superoxide dismutase, hydroperoxide, interstitial nephrite

Никто не сомневается в важности и необходимости любого органа для нормальной жизнедеятельности человека, и почки являются одним из самых ярких подтверждений этого утверждения, так как они способны как удалять из организма продукты метаболизма и ненужные вещества, так и предотвращать потери необходимых. Почки кроме

экскреторной, осмо-, волюмо- и ионорегулирующей функций, стабилизирующей кислотно-основное равновесие, оказывают еще инкреторную и метаболическую, и их значение для организма настолько велико и разнообразно, что очевидно необходимость поддержания почек в нормальном состоянии для обеспечения здоровья,

а нарушения их работы свидетельствует о заболеваниях, причем чаще двусторонних диффузных, которые в прогностическом плане зависят от формы и тяжести, способных закончиться как полным выздоровлением, так и развитием почечной недостаточности, способной привести к смертельному исходу.

Целью нашей работы было изучение функционально-морфологического состояния почек, перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в условиях экспериментального токсического поражения почек у крыс.

Материал и методы исследования

Для решения поставленной цели мы последовательно решали следующие задачи. Первое создание экспериментальной токсической почечной недостаточности по G. Greven, которую моделировали на 30 крысах линии Вистар путем внутримышечного введения 0,8 мл/100 г 50,0% глицерина, разведенного на физиологическом растворе, после предварительного, в течение суток, лишения крыс пищи и воды [1, 4]. Для безопасности и уменьшения гибели животных половину дозы вводили в правую заднюю лапу, а другую – в левую. Из 30 крыс, которым ввели глицерин, в течение первой недели погибло 4, и в эксперимент были взяты 26 животных.

Второе: изучение функционального состояния почек, в частности, водо- и ионовывделительной функции, а также способности предотвращать возникновение протеинурии. О водовывделительной функции мы судили по спонтанному диурезу, скорости клубочковой фильтрации и объему канальцевой реабсорбции воды. Для чего крыс на шесть часов помещали в специальные клетки-воронки и собирали мочу, в которой, а также в плазме крови, методом Поппера определяли содержание эндогенного креатинина [7] с последующим расчетом основных процессов мочеобразования [9]. Для интерпретации результатов и объяснений механизмов, влияющих на клубочковую фильтрацию, с помощью ультразвукового флуометра Ttransonic HT 313 инвазивным способом определяли объемную скорость почечного кровотока. О степени протеинурии судили по уровню общего белка в моче, которую определяли методом Лоури [10]. Содержание натрия в плазме крови и моче определяли методом пламенной фотометрии, с последующим расчетом экскреции, фильтрационного заряда и канальцевой реабсорбции иона [7].

Третье: о состоянии перекисного окисления липидов судили по содержанию гидроперекисей в плазме крови и малонового диальдегида в эритроцитах, а об антиоксидантной защите – по активности каталазы и супероксиддисмутазы в эритроцитах [3, 6].

Четвертое: исследования морфологического состояния почек как доказательной базы успешного создания модели токсического поражения почек проводились после соответствующей фиксации биоматериала, изготовления мазков (толщина срезов 7–8 мкм, окраска гематоксилин-эозином) и их световой микроскопии (увеличение в 600 и 1500 раз) с фотографированием препаратов.

Обязательным условием опытов было наличие в поилках клеток воды, которая убиралась за 30–40 минут до начала опытов, что позволяло предотвратить как обезвоживание, так и гипергидратацию

крыс, и приблизить их к водному балансу. Полученные результаты статистически обрабатывались с помощью компьютерной программы «GraphPad Prism 5.03», степень достоверности оценивалась по t-критерию Стьюдента (параметрический метод).

Результаты исследования и их обсуждение

Через три дня после введения крысам глицерина поставили первые опыты, которые повторили в конце первой и второй недели, то есть проводили трехкратные исследования в течение двух недель в условиях острого поражения почек. В результате чего было выявлено, что на третий день спонтанный диурез у модельных крыс по сравнению интактными, у которых он был $0,19 \pm 0,01$ мл/ч/100 г, уменьшился на 11,5%, а к концу недели достоверно ($p < 0,02$) снизился на 26,4% (табл. 1). Еще значительнее снижение наблюдалось через две недели после инъекции глицерина, когда количество выделившейся мочи стало $0,092 \pm 0,008$ мл/ч/100 г, что было меньше исходного уровня на 48,6% ($p < 0,001$).

Уменьшение диуреза могло быть обусловлено изменением основных процессов мочеобразования и их расчет показал, что на третий день после введения глицерина особых отличий, кроме тенденции к снижению скорости клубочковой фильтрации, не отмечалось (табл. 1), но в конце первой недели она с контрольного уровня в $12,83 \pm 0,94$ мл/ч/100 г достоверно ($p < 0,05$) снизилась до $10,16 \pm 0,72$ мл/ч/100 г. Канальцевая реабсорбция воды при этом не менялась ($98,88 \pm 0,07\%$ – контроль, и $98,68 \pm 0,12\%$ – опыт) и оставалась на этом уровне и в конце второй недели, в то время как скорость клубочковой фильтрации стала достоверно ($p < 0,001$) меньше контроля на 43,5%, что, в общем-то было соразмерно изменению диуреза (табл. 1).

Выявленное снижение клубочковой фильтрации очевидно было обусловлено уменьшением объемной скорости почечного кровотока, которая в конце второй недели после введения крысам глицерина была $6,94 \pm 0,52$ мл/мин, в то время как у интактных крыс она достигала величины в $10,24 \pm 0,68$ мл/мин ($p < 0,002$).

Параллельно с изменением водовывделительной функции почек появилась протеинурия, которая через семь дней после введения глицерина имела достоверное ($p < 0,05$) отличие (табл. 1), но особенно она повысилась к концу второй недели, когда количество белка в моче превосходило в 2,4 раза величину контроля, равного $8,35 \pm 0,58$ мкг/мл. Одновременно в содержании общего белка в плазме крови наметилась тенденция

к снижению ($64,09 \pm 2,31$ г/л – контроль, $62,54 \pm 1,66$ г/л – опыт).

Одновременно уровень креатинина в плазме крови, начиная с третьего дня

после введения глицерина, начал повышаться (табл. 1) и к концу второй недели ($84,25 \pm 3,23$ мкмоль/л) достоверно ($p < 0,01$) превысил контроль ($72,64 \pm 2,28$ мкмоль/л).

Таблица 1

Показатели функционального состояния почек у крыс после введения глицерина

Исследуемые показатели	Стат. показат.	Контроль	Через 3 дня	Через 1 неделю	Через 2 недели
Диурез (мл/ч/100 г)	$M \pm m$	$0,19 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,015$ $p < 0,02$	$0,092 \pm 0,008$ $p < 0,001$
Клубочковая фильтрация (мл/ч/100 г)	$M \pm m$	$12,83 \pm 0,94$	$11,58 \pm 0,95$	$10,16 \pm 0,72$ $p < 0,05$	$7,25 \pm 0,46$ $p < 0,001$
Канальцевая реабсорбция (%)	$M \pm m$	$98,88 \pm 0,07$	$98,64 \pm 0,18$	$98,62 \pm 0,14$	$98,68 \pm 0,12$
Общий белок крови (г/л)	$M \pm m$	$64,09 \pm 2,31$	$62,76 \pm 1,75$	$61,32 \pm 2,28$	$60,12 \pm 2,45$
Степень протеинурии (мкг/мл)	$M \pm m$	$8,35 \pm 0,58$	$9,68 \pm 0,82$	$11,12 \pm 0,98$ $p < 0,05$	$20,04 \pm 1,86$ $p < 0,001$
Содержание креатинина в крови (мкмоль/л)	$M \pm m$	$72,64 \pm 2,28$	$73,16 \pm 1,88$	$77,38 \pm 2,72$	$84,25 \pm 3,23$ $p < 0,01$
Содержание натрия в крови (ммоль/л)	$M \pm m$	$134,35 \pm 2,82$	$132,56 \pm 2,15$	$130,18 \pm 1,77$	$129,84 \pm 1,96$
Экскреция натрия (мкмоль/ч/100 г)	$M \pm m$	$13,37 \pm 1,05$	$15,52 \pm 1,87$	$17,57 \pm 1,42$ $p < 0,05$	$21,85 \pm 1,64$ $p < 0,001$
Фильтрационный заряд натрия (мкмоль/ч/100 г)	$M \pm m$	$1637,5 \pm 121,4$	$1473,6 \pm 105,6$	$1269,7 \pm 74,48$ $p < 0,05$	$903,6 \pm 50,6$ $p < 0,001$
Канальцевая реабсорбция натрия (%)	$M \pm m$	$99,18 \pm 0,09$	$98,94 \pm 0,12$	$98,58 \pm 0,18$ $p < 0,01$	$97,54 \pm 0,26$ $p < 0,001$

Изучение электролитовыделительной функции почек, в частности, обмена натрия, показало, что его содержание в плазме крови крыс в течение первой недели после введения глицерина оставалось близким к контрольным значениям (табл. 1), а к концу второй недели незначительно снизилось ($134,35 \pm 2,82$ ммоль/л – контроль, $128,84 \pm 1,96$ ммоль/л – опыт). Выделение натрия с мочой, наоборот, начало повышаться и по прошествии одной недели превышало контроль, равный $13,37 \pm 1,05$ мкмоль/ч/100 г на 31,4% ($p < 0,05$), а через две недели еще значительней – на 63,4% ($p < 0,001$). Выявленный натриурез был обусловлен снижением канальцевой реабсорбции иона (табл. 1), так как его фильтрационный заряд как одна из двух величин, влияющих на экскрецию натрия, уменьшился, что, наоборот, должно было вызвать гипонатриурез. Так, количество профильтровавшегося натрия у контрольных крыс составляло $1637,5 \pm 121,4$ мкмоль/ч/100 г, и в конце первой недели оно снизилось до $1269,7 \pm 74,48$ мкмоль/ч/100 г ($p < 0,05$), и еще значительней ($903,6 \pm 50,6$ мкмоль/ч/100 г) при завершении опытов. Уменьшение фильтрационного заряда было вызвано торможением скорости клубочковой фильтрации.

Созданная модель токсического почечного поражения с отмеченными функциональными изменениями почек наверняка должна оказывать влияние на состояние перекисного окисления липидов и активность антиоксидантной защиты как единого и взаимосвязанного процесса. Потребляемый кислород в организме окисляет органические субстраты в цепях переноса электронов и восстанавливается до супероксидного радикала, превращающегося в перекись водорода, которую фагоцитирующие клетки преобразуют в гипохлорит, необходимый для разрушения стенок бактериальных клеток, а избыток удаляется глутатионпероксидазой и каталазой [2].

Проведенные исследования показали, что через три дня после введения глицерина изучаемые показатели этих двух систем не изменились и содержание малонового диальдегида и гидроперекисей, активность каталазы и супероксиддисмутазы оставались в пределах статистических колебаний контрольных значений, но уже в конце первой недели отмечалось примерно равнозначное усиление как перекисидации липидов, так и антиоксидантной защиты (табл. 2), но уже к концу второй недели начала преобладать окислительная дегградация липидов, в результате чего содержание

гидроперекисей с интактного уровня в $4,66 \pm 0,21$ мкмоль/л повысилось до $6,54 \pm 0,35$ мкмоль/л ($p < 0,001$), а малонового диальдегида – с $32,45 \pm 2,28$ мкмоль/л до $44,58 \pm 2,55$ мкмоль/л ($p < 0,01$), а выявленное в недельных опытах усиление антиоксидантной защиты, наоборот, стало

меньше контроля, и активность супероксиддисмутазы с $68,84 \pm 2,49$ ед. ингибир., которая была у контрольных крыс, снизилась до $57,25 \pm 2,76$ ед. ингибир. ($p < 0,01$). Одновременно отмечалось и ослабление активности каталазы, но без достоверного отличия (табл. 2).

Таблица 2

Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты у крыс после введения глицерина

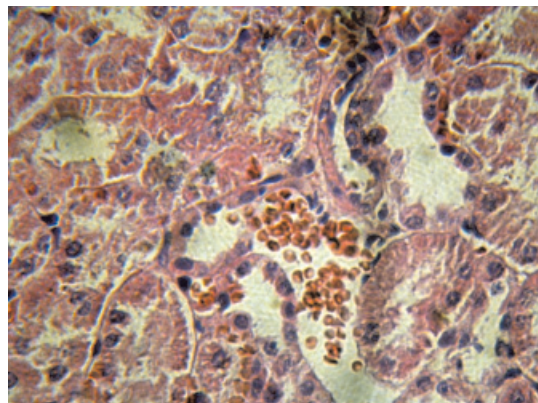
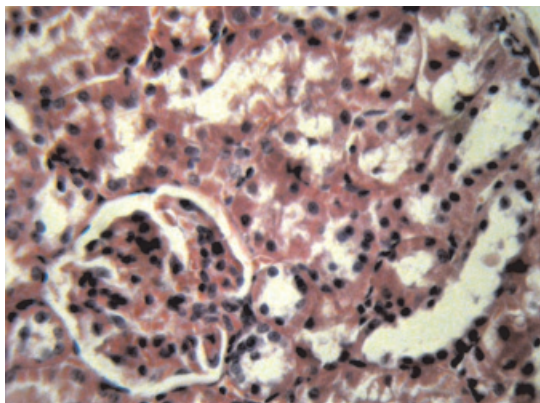
Исследуемые показатели	Стат. показатели	Контроль	Через 3 дня	Через 1 неделю	Через 2 недели
Гидроперекиси (мкмоль/л)	M ± m	$4,66 \pm 0,21$	$4,82 \pm 0,32$	$5,64 \pm 0,37$ $p < 0,05$	$6,54 \pm 0,35$ $p < 0,001$
Малоновый диальдегид (мкмоль/л)	M ± m	$32,45 \pm 2,28$	$34,58 \pm 2,84$	$41,62 \pm 3,16$ $p < 0,05$	$44,58 \pm 2,55$ $p < 0,001$
Супероксиддисмутазы (ед. ингибирования)	M ± m	$68,84 \pm 2,49$	$71,25 \pm 4,05$	$79,26 \pm 3,89$ $p < 0,05$	$57,25 \pm 2,76$ $p < 0,01$
Каталаза ($\times 10^{-4}$ МЕ/г Hb)	M ± m	$7,18 \pm 0,29$	$6,96 \pm 0,41$	$8,61 \pm 0,44$ $p < 0,02$	$6,21 \pm 0,34$

Очевидно, что усиление перекисидации липидов и ослабление антиоксидантной защиты связано с токсическим поражением почек и вероятным нарушением синтеза и секреции эритропоэтинов, и тем самым ведет к снижению интенсивности эритропоэза и количества эритроцитов, о чем мы писали ранее [8]. Аналогичные результаты усиления перекисидации липидов и ослабления антиоксидантной защиты, в том числе и в тканях почек, были получены на крысах при экспериментальной хронической гипобарической гипоксии [5].

Морфологическое исследование почек проводили только через две недели после введения крысам глицерина, и для сравнения изучали почки интактных животных, у которых все канальцы коркового вещества были плотно упакованы, перикарионы эпителиоцитов компактны, ядра мономорфные, а просветы канальцев узкие и свободные, и сохранялись таковыми в мозговом веществе. Нарушений в микроциркуляции и каких-либо особенностей гемодинамики не выявлено. У модельных крыс в клубочках нефронов на фоне распада отдельных капиллярных сегментов отмечалось сочетание различных явлений от зияния и пустоты до эритроцитарных стазов с мелкими кровоизлияниями. Эндотелий капсулы Боумена–Шумлянского и мезангий были набухшим, но просвет большинства капсул оставался свободен. В извитых канальцах отмечались

разной выраженности дистрофические изменения – от набухания эпителиоцитов до зернистой трансформации перикариона и их деструкции (рисунок). В мозговом веществе выявлялось уплотнение эпителия канальцев с уплотнением перикарионов, базофилией ядер, сужением просветов и наличием в них белковых слепков, а у верхушек пирамид, наоборот, – разрежение перикарионов и расширение просветов мочевых протоков. Также выявлялся канальцевый и межпочечный кальциноз. В интерстиции почек отмечался застой в венозном секторе с очагами мелких кровоизлияний, многочисленные инфильтраты из лимфоцитарно-гистиоцитарных элементов при частичной деструкции канальцев, расположенных рядом (рисунок).

Таким образом, через две недели после введения крысам линии Вистар 50,0% глицерина в дозе 0,8 мл/100 г у них в почках отмечается экссудативная гломерулопатия, острый канальцевый некроз и интерстициальный нефрит с застойно-геморрагическими элементами, снижение спонтанного диуреза вследствие торможения скорости клубочковой фильтрации и уменьшения объемной скорости почечного кровотока, протеинурия, натриурез, увеличение уровня креатинина в плазме крови, усиление окислительной дегградации липидов и снижением антиоксидантной защиты.



*Морфология почек крыс через две недели после введения глицерина.
Окраска гематоксилин-эозином. Ув. ×600*

Список литературы

1. Борисова И.В. Ренальные и нейропротекторные эффекты перфторана на модели токсического поражения почек у крыс / И.В. Борисова, С.Ю. Штрыголь // Биомедицинский журнал. –2004. – Т. 5. – С. 136–139
2. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты // Вестник Российской академии медицинских наук. –1998. – № 7. – С. 43–51.
3. Данилова Л.А. Справочник по лабораторным методам исследования / под ред. Л.А. Даниловой. – СПб.: Питер, 2003. – 736 с.
4. Метиларгинины у крыс в глицериновой модели острой почечной недостаточности / М.А. Гилянский, Р.И. Айзман, Г.А. Корощенко, Т.В. Латышева и др. // Бюллетень СО РАМН. –2010. – Т. 30, № 4. – С. 82–86.
5. Заморский И.И. Липидная и белковая пероксидация в почках и плазме крови крыс в условиях хронической гипоксии / И.И. Заморский, С.П. Пасевич // Бук. мед. вестник. –2012. – Т. 16, № 3 (63), Ч.2. – С. 132–135.
6. Камышников В.С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика. – Минск: Интерпрессервис, 2003. – Т.2. – 463 с.
7. Рябов С.И. Диагностика болезней почек / С.И. Рябов, Ю.В. Наточик, Б.Б. Бондоренко. – Л.: Медицина, 1979. –256 с.
8. Фидарова А.М. Особенности некоторых гематологических показателей у крыс при экспериментальной почечной недостаточности, гипокальциемии и их сочетания / А.М. Фидарова, И.Г. Джиоев // Вестник международной академии наук экологии и безопасности жизнедеятельности. – 2008. – Т.14, № 3. – С. 53–56.
9. Шюк О. Функциональное исследование почек // Авиценум. – Прага, 1975. –333 с.
10. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr L.A., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
3. Danilova L.A. Spravochnik po laboratornym metodam issledovaniya / Pod red. L.A. Danilovoj. SPb.: Piter, 2003, 736 p.
4. Gilinskij M.A. Metilargininy u krys v glicerinovoj modeli ostroj pochechnoj nedostatochnosti / M.A. Gilinskij, R.I. Ajzman, G.A. Koroshhenko, T.V. Latysheva i dr. // Bjulleten' SO RAMN, 2010, vol. 30, no. 4. pp. 82–86.
5. Zamorskij I.I. Lipidnaja i belkovaja peroksidacija v pochkah i plazme krovi krys v uslovijah hronicheskoj gipoksii / I.I. Zamorskij, S.P. Pasevich // Buk. med. Vestnik, 2012, vol. 16, no 3, Ch. 2. pp. 132-135.
6. Kamyshnikov V.S. Kliniko-biohimicheskaja laboratornaja diagnostika. Mn.: Interpresservis, 2003, vol. 2, 463 p.
7. Rjabov S.I. Diagnostika boleznej pochek / S.I. Rjabov, Ju.V. Natochik, B.B. Bondorenko. L., Medicina, 1979, 256 p.
8. Fidarova A.M. Osobennosti nekotoryh gematologicheskikh pokazatelej u krys pri jeksperimental'noj pochechnoj nedostatochnosti, gipokal'ciemii i ih sochetanija / A.M. Fidarova, I.G. Dzhioev // Vestnik mezhdunarodnoj akademii nauk jekologii i bezopasnosti zhiznedejatel'nosti, 2008, vol. 14, no. 3, pp. 53–56
9. Shjuk O. Funkcional'noe issledovanie pochek. Avicenum, Praga, 1975, 333 p.
10. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr L.A., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem, 1951, vol. 193, pp. 265–275.

References

1. Borisova I.V. Renal'nye i nejroprotektornye jeffekty perftorana na modeli toksicheskogo porazhenija pochek u krys / I.V. Borisova, S.Ju. Shtrygol' // Biomedicinskij zhurnal, 2004, vol. 5, pp. 136–139.
2. Vladimirov J.A. Svobodnye radikaly i antioksidanty // Vestnik Rossijskoj Akademii Medicinskih Nauk, 1998, no 7, pp. 43–51.

Рецензенты:

Болиева Л.З., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой фармакологии и клинической фармакологии, ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Владикавказ;

Бурдули Н.М., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой терапии ФПДО, ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Владикавказ.

Работа поступила в редакцию 07.08.2013.