Механизмы дизрегуляции нитроксидергичной системы в тканях пародонта крыс при избыточном поступлении нитрата и фторида натрия

Mechanisms of nitroxide-ergic dysregulation in tissues of parodontium in rats under combined excessive sodium nitrate and fluoride intake

Алексей В. Богданов, Юлия М. Гришко, Виталий А. Костенко
ВЫСШЕЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧЕБНОЕ ЗАВЕДЕНИЕ УКРАИНЫ
«УКРАИНСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ СТОМАТОЛОГИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ», ПОЛТАВА, УКРАИНА,

РЕЗЮМЕ

Введение: поступление в организм неорганических нитратов сопровождается образованием избыточного количества оксида азота (NO), уровень которого поддерживается механизмом ауторегуляции, известным как цикл NO. Предположительно этот процесс может нарушаться фторидами, способными ингибировать аргиназный путь метаболизма L-аргинина, конкурирующий с NO-синтазным.

Цель работы: изучение механизмов дизрегуляции окислительного (NO-синтазного) и неокислительного (аргиназного) путей метаболизма L-аргинина в тканях пародонта при сочетанном избыточном введении нитрата и фторида натрия.

Материал и методы. Исследования проведены на 90 белых крысах линии Вистар. В гомогенате мягких тканей пародонта спектрофотометрически оценивали суммарную активность NO-синтазы (NOS), аргиназы, орнитиндекарбоксилазы и концентрацию пероксинитрита.

Результаты: характерное для изолированного введения нитрата натрия угнетение суммарной активности NOS изменяется при сочетанном введении нитрата и фторида натрия состоянием её гиперактивации, что сопровождается повышением концентрации пероксинитрита. При этом активность аргиназы и орнитиндекарбоксилазы существенно уменьшается. Введение ингибитора iNOS аминогуанидина (20 мг/кг, 2 раза в неделю в течение эксперимента) увеличивает в тканях пародонта активность аргиназы и орнитиндекарбоксилазы, а L-аргинина (500 мг/кг, 2 раза в неделю) – активность аргиназы. Применение скавенджера пероксинитрита L-селенометионина (3 мг/кг, 2 раза в неделю) и ингибитора активации NF-κB JSH-23 (4-метил-N-(3-фенилпропилбензол-1,2-диамин, 1 мг/кг, 2 раза в неделю) при моделировании бинарной интоксикации нитратом и фторидом натрия уменьшает суммарную активность NOS и концентрацию пероксинитрита, увеличивает активность орнитиндекарбоксилазы.

Выводы: сочетанное действие нитрата и фторида натрия в течение 30 суток приводит к дизрегуляторному увеличению активности NO-синтазы и снижению ферментов аргиназного пути метаболизма L-аргинина в мягких тканях пародонта, чему способствует гиперактивация NF-κB, iNOS и возрастание образования пероксинитрита.

Ключевые слова: интоксикация нитратами и фторидами, NO-синтаза, аргиназа, пародонт.

ABSTRACT

Introduction: intake of inorganic nitrates is typically accompanied by production of excessive amount of nitric oxide (NO), which level is maintained by the mechanism of autoregulation known as the NO cycle. Hypothetically, this process may be disrupted with fluorides that are able to suppress arginase pathway of L-arginine metabolism, which competes with NO-synthase pathway.

Aim: to study mechanisms of disregulation of oxidative (NO-synthase) and non-oxidative (arginase) metabolic pathways of L-arginine in the tissues of periodontium under combined excessive sodium nitrate and fluoride intake.

Material and methods: these investigations were carried out on 90 white Wistar rats. Homogenates of parodontium soft tissues were used to assess spectrophotometrically the total activities of NO-synthase (NOS), arginase, ornithine decarboxylase as well as the peroxynitrite concentration.

Results: typical for the isolated sodium nitrate administration inhibition of total NOS activity varies under combined administration of nitrate and sodium fluoride and is usually manifested by its hyperactivation that is accompanied by an increase in peroxynitrite concentration. At this time arginase and ornithine decarboxylase activity is observed to be substantially reduced. The administration of aminoguanidine, an iNOS inhibitor, (20 mg/kg, twice a week during the experiment) increases arginase and ornithine decarboxylase activities, and the administration of L-arginine (500 mg/kg, twice a week) results in the increase of arginase activity. The administration of L-selenomethionine, a peroxynitrite scavenger (3 mg/kg, twice a week), and JSH-23 (4-methyl-N-(3-phenylpropyl) benzene-1,2-diamine, an inhibitor of NF-κB activation (1 mg/kg, twice a week) for modeling binary nitrate and fluoride intoxication reduces the total concentration of NOS activity and peroxynitrite concentration, and increases ornithine decarboxylase activity.

Conclusions: the combined effect of nitrate and sodium fluoride for 30 days leads to disregulatory increased activity of NO-synthase enzymes and reduction of arginase pathway of L-arginine in the soft tissues of parodontium that is promoted by hyperactivation of iNOS and NF-κB, and increased peroxynitrite production.

Key words: nitrate and fluoride poisoning, NO-synthase, arginase, parodontium.

Wiad Lek 2016, 69, 3 (cz. II), 457-461

ВВЕДЕНИЕ

В течение последних десятилетий в мире существенно обострилась проблема комбинированного влияния на здоровье населения экологически неблагоприятных факторов химической природы. Среди них ведущие позиции занимают нитраты и фториды [14,20].

Поступление в организм неорганических нитросоединений сопровождается образованием избыточного количества оксида азота (NO) [11]. Тем не менее в клетках существует эффективная система самозащиты, направленная на поддержание концентрации этих молекул в пределах нормы. Так, при избыточном образовании NO из экзогенных источников ограничивается его эндогенный биосинтез по механизму отрицательной обратной связи («цикл NO»), возрастает инактивация NO активными формами кислорода с дальнейшим переходом NO в менее токсические нитрат-ионы (NO_3^-) и т.д [12].

Можно допустить, что нарушения приведенных механизмов самозащиты организма от избыточного образования активных форм азота может быть важным звеном в патогенезе заболеваний различных органов, в том числе пародонта. Последний подвергается влиянию высоких концентраций NO, поступающих из разных источников (экзогенные донаторы, микробиота полости рта, слюнные железы, аккумулирующие нитраты путем энтеро-саливарной циркуляции, функционирование индуцибельной NO-синтазы – iNOS) [3,11,12].

Нарушение ауторегуляции уровня NO при избыточном поступлении неорганических нитросоединений в организм млекопитающих можно ожидать при активации NO-синтаз (NOS), расстройствах реципрокных отношений между окислительным (NOS) и конкурентным – неокислительным (аргиназным) путями метаболизма L-аргинина, дизрегуляцией цикла NO/пероксинитрит [3,16]. Изменения уровня NO и активности ферментов аргиназного пути (аргиназы, орнитиндекарбоксилазы) в тканях пародонта наблюдаются уже на ранних фазах развития пародонтита [15].

Предположительно, к числу факторов, вызывающих дизрегуляцию системы NO, можно отнести фториды. Известно, что ионы F^- способны обратимо и неконкурентно угнетать аргиназу (величина Ki = 1,3 – 1,8 мМ, при этом при pH 7,4 это действие является на порядок более эффективным, чем при pH 9,4) [1,21], увеличивать генерацию супероксидного анион-радикала в тканях слюнных желез [4]. Это создает предпосылки к активации транскрипционного ядерного фактора κB (NF-κB) и iNOS, а также образованию высокотоксичного пероксинитрита.

Тем не менее, роль нарушений ауторегуляции уровня NO и образования активных форм азота в тканях пародонта при сочетанном действии нитратов и фторидов остается не выясненной. Решение этого вопроса важно для разработки новых технологий профилактики и лечения последствий сочетанного действия нитрат- и фторид-ионов на ткани пародонта при их поступлению с водой, пищей, лекарствами, средствами гигиены полости рта и т.д.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Целью работы было изучение механизмов дизрегуляции окислительного (NO-синтазного) и неокислительного (аргиназного) путей метаболизма L-аргинина в тканях пародонта при сочетанном избыточном введении нитрата и фторида натрия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования были проведены на 90 белых крысах линии Вистар массой 180-200 г в следующих сериях опытов: в первой – необходимые показатели изучали у интактных животных (контрольная серия), во второй – после введения нитрата натрия (200 мг/кг массы тела) в течение 30 суток; в третьей – после введения фторида натрия (10 мг/кг массы тела) на протяжении 30 суток; в четвертой – после сочетанного введения нитрата натрия (200 мг/кг массы тела) и фторида натрия (10 мг/кг массы тела) на протяжении 30 суток, у последующих – в течение периода 30-дневного сочетанного действия нитрата и фторида натрия животным вводили соответственно селективный ингибитор нейрональной NO-синтазы (nNOS) – 7-нитроиндазол («Sigma-Aldrich, Inc.», США) в дозе 30 мг/кг [10], селективный ингибитор iNOS – аминогуанидин («Sigma-Aldrich, Inc.», США) – 20 мг/кг [19], субстрат NOS и аргиназы – L-аргинин («Kyowa Hakko Kogyo Co LTD», Япония) – 500 мг/кг [2], скавенджер пероксинитрита – L-селенометионин («Sigma-Aldrich, Inc.», США) – 3 мг/кг [10], ингибитор активации NF-κB – JSH-23 (4-метил-N-(3-фенилпропилбензол-1,2-диамин, «Santa Cruz Biotechnology, ФРГ) – 1 мг/кг [9]. Все соединения вводили внутрибрюшинно 2 раза в неделю в течение периода воспроизведения 30-дневой сочетанной интоксикации нитратом и фторидом натрия. Эвтаназию животных производили методом дислокации шейных позвонков под эфирным наркозом.

Активность NOS определяли по разнице концентрации NO_2^- до и после инкубации гомогената мягких тканей пародонта в среде, содержащей L-аргинин (субстрат NOS) и никотинам идадениндинуклеотидфосфат восстановленный (НАДФН). Концентрацию нитрит-ионов определяли путем образования

диазосоединений в реакции с сульфаниловой кислотой, а затем проводили реакцию с α-нафтилэтилендиамином, в результате которой образуются производные красного цвета (азокрасители) [8].

Концентрацию пероксинитрита в гомогенате оценивали спектрофотометрически по поглощению при длине волны 355 нм [7].

Определяли активность в тканях пародонта ферментов, отражающих состояние аргиназного пути метаболизма L-аргинина: аргиназы [5] и орнитиндекарбоксилазы [6].

Полученные данные подвергали статистической обработке. Для проверки распределения на нормальность был использован расчет критерия Шапиро-Уилка. Если данные отвечали нормальному распределению, то для их сравнения использовали t-критерий Стьюдента для независимых выборок. В случае, когда ряды данных не подлежали нормальному распределению, статистическую обработку осуществляли, используя непараметрический метод – тест Манна-Уитни. Статистические расчеты проводили с использованием программ «Microsoft Excel 2007» и «StatisticSoft 6.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Введение нитрата натрия существенно влияет на активность ферментов окислительного та неокислительного путей метаболизма L-аргинина в тканях пародонта (табл. I): суммарная активность NOS снижается на 35,3% (p<0,001), аргиназы и орнитиндекарбоксилазы возрастает – соответственно на 85,9%, p<0,01) и 31,1%, p<0,01). Концентрация нитрит-ионов возрастает на 75,0% (p<0,01). Содержание пероксинитрита в тканях пародонта существенно не изменяется. При низкой концентрации это соединение выполняет функцию сигнальной молекулы [18].

Снижение активности NOS является закономерным следствием функционирования цикла оксида азота, когда при условиях экзогенного поступления источника NO ограничивается эндогенный синтез этого вещества при участии NOS [12]. При этом создаются предпосылки для сдвига реакций метаболизма L-аргинина в направлении неокислительного (аргиназного) пути.

Введение фторида натрия увеличивает суммарную активность NOS в тканях пародонта – на 28,5% (p<0,001). Концентрация нитрит-ионов и пероксинитрита не изменяется.

Активность аргиназы и орнитиндекарбоксилазы в тканях пародонта уменьшается – соответственно на 54,7% (p<0,05) и 32,3% (p<0,01), что подтверждает способность фторид-ионов угнетать аргиназу [1,21].

При сочетанном действии нитрата и фторида натрия суммарная активность NOS в тканях пародонта превышает на 59,3% (p <0,001) данные интактной группы, в 2,5 раза (p <0,001) – результат второй серии, и на 23,9% (p<0,01) – результат третьей серии. Концентрация нитрит-ионов в тканях пародонта превышает результат интактной группы животных – на 62,5% (p<0,01). Содержание пероксинитрита в тканях пародонта на 37,9% (p<0,02) превышает данные интактной группы, и на 28,4% (p<0,05) – результат второй серии.

В этих условиях активность аргиназы и орнитиндекарбоксилазы в тканях пародонта уступает соответственно на 63,5% (p<0,01) и 41,2% (p<0,02) данным интактной группы, и на 80,4% (p<0,001) и 55,1% (p<0,001) – результатам второй серии.

Такие изменения указывают как развитие дизрегуляторной патологии, связанной с нарушением ауторегуляции уровня NO в тканях пародонта. То есть, при сочетанном

Таблица 1. Показатели системы NO и аргиназного пути метаболизма L-аргинина в тканях пародонта при избыточном поступлении нитрата и фторида натрию.

Показатели	Серии опытов			
	Интактные животные	Введение нитрата натрия	Введение фторида натрия	Сочетанное введение нитрата и фторида натрия
NOS, мкмоль NO_2^- /г·мин.	4,59±0,09	2,97±0,10*	5,90±0,19*	7,31±0,28 */**/***
Концентрация NO_2^-, мкмоль/г	0,08±0,01	0,14±0,01*	0,10±0,01	0,13±0,01*
Пероксинитрит, мкмоль/г	0,95±0,04	1,02±0,04	1,12±0,08	1,31±0,10*/**
Аргиназа, мкмоль/г·белка	1,70±0,23	3,16±0,33*	0,77±0,39*	0,62±0,17*/**
Орнитиндекарбок-силаза, нмоль/г·мин.	225,4±14,4	295,4±13,5*	152,5±12,0*	132,5±23,7*/**

(M±m, n=20)

Примечание: * – p<0,05 в сравнении с данными второй серии (интактные крысы);

** – p<0,05 в сравнении с данными второй серии;

*** – p<0,05 в сравнении с данными третьей серии.

воздействии нитрата и фторида натрия создаются условия для образования высоких концентраций NO из экзогенного источника (нитратов), угнетение фторид-ионами аргиназного пути метаболизма L-аргинина и связанной с этим гиперактивации NOS, что приводит к еще большей продукции NO. Следствием этого является образование высокотоксичного пероксинитрита.

Для оценки вклада различных источников в дизрегуляцию отношений между NOS и аргиназным путем метаболизма L-аргинина, сопряженности цикла NO/пероксинитрит мы исследовали влияние на исследуемые показатели ряда физиологически активных соединений: ингибиторов и субстрата NOS, скавенджера пероксинитрита и ингибитора NF-κB. Последний, как известно, принимает участие в экспрессии гена iNOS [17].

Введение селективного ингибитора nNOS 7-нитроиндазола и селективного ингибитора iNOS аминогуанидина при воспроизведении сочетанной 30-дневной интоксикации нитратом и фторидом натрия закономерно сказывается на показателях системы NO в тканях пародонта (таблица II). Так, суммарная активность NOS снижается – соответственно на 36,7% (p<0,001) и 55,5% (p<0,001) по сравнению с данными четвертой серии. В то же время, содержание нитрит-ионов и пероксинитрита существенно не изменяется.

Введение 7-нитроиндазола в условиях эксперимента не влияет на активности ферментов аргиназного пути метаболизма L-аргинина – аргиназы и орнитиндекарбоксилазы в тканях пародонта. Применение аминогуанидина – увеличивает активность аргиназы и орнитиндекарбоксилазы – соответственно в 3,4 раза (p<0,01) и на 68,5% (p<0,02) по сравнению с данными четвертой серии. Это отражает роль iNOS в угнетении ферментов аргиназного пути метаболизма L-аргинина.

При введении L-аргинина при моделировании сочетанной 30-дневной интоксикации нитратом и фторидом натрия в тканях пародонта активируется неокислительный путь его метаболизма: суммарная активность NOS уступает (на 19,3%, p<0,01), а активность аргиназы – превышает (в 2,6 раза, p<0,02) соответствующий показатель четвертой серии. В этих условиях концентрации нитрит-ионов и пероксинитрита существенно не изменяются.

Введение крысам скавенджера пероксинитрита L-селенометионина и JSH-23, который нарушает процесс транслокации NF-κB в ядро без влияния на деградацию IκB [9], в условиях воспроизведения сочетанной 30-дневной интоксикации нитратом и фторидом натрия существенно сказывается на показателях системы NO в тканях пародонта. Так, суммарная активность NOS – соответственно на 36,0% (p <0,001) и 38,4% (p <0,001) уступает данным четвертой серии. В этих условиях активность орнитиндекарбоксилазы – соответственно на 56,8% (p<0,05) и 82,6% (p<0,01) превышает показатели четвертой серии.

Увеличение активности орнитиндекарбоксилазы улучшает синтез полиаминов, регулирующих процессы репликации и транскрипции ДНК, биосинтеза белков и пролиферации клеток [13].

Применение L-селенометионина в условиях эксперимента эффективно снижает в тканях пародонта концентрацию пероксинитрита – на 32,8% (p <0,01) по сравнению с данными четвертой серии.

Полученные результаты свидетельствуют, что активация NF-κB и образование пероксинитрита способствуют при сочетанном действии нитрат- и фторид-ионов дальнейшей гиперактивации NOS и еще большему нарушению в тканях пародонта аргиназного пути метаболизма L-аргинина, что вызывает уменьшение активности орнитиндекарбоксилазы – ключевого фермента биосинтеза полиаминов, необходимых для восстановления поврежденных клеток.

ВЫВОДЫ

1. Сочетанное действие нитрата и фторида натрия в течение 30 суток приводит к дизрегуляторным

Таблица II. Влияние физиологически активных соединений на показатели системы NO и аргиназного пути метаболизма L-аргинина в тканях пародонта при избыточном поступлении нитрата и фторида натрия (M±m, n=30).

Показатели	Сочетанное введение нитрата и фторида натрия					
	Контроль	+ 7-нитроин-дазол	+ амино-гуаии-дин	+ L-аргинин	+ L-селеноме-тионин	+ JSH-23
NOS, мкмоль NO_2^- /г·мин.	7,31±0,28	4,63±0,35 *	3,25±0,19 *	5,90±0,18 *	4,68±0,16 *	4,50±0,16 *
Концентрация NO_2^-, мкмоль/г	0,13±0,01	0,13±0,01	0,11±0,01	0,14±0,01	0,11±0,01	0,10±0,01
Пероксинитрит, мкмоль/г	1,31±0,10	1,34±0,11	0,98±0,11	1,22±0,10	0,88±0,08 *	1,01±0,11
Аргиназа, мкмоль/г·белка	0,62±0,17	1,40±0,48	2,11±0,39 *	1,63±0,26 *	1,52±0,45	1,54±0,40
Орнитиндекарбоксилаза, нмоль/г·мин.	132,5±23,7	163,5±31,1	223,3±13,7 *	194,4±21,1	207,7±19,1 *	241,9±14,1 *

Примечание: * – p<0,05 в сравнении с данными четвертой серии.

изменениям активности ферментов окислительного (NO-синтазного) и неокислительного (аргиназного) путей метаболизма L-аргинина в мягких тканях пародонта: характерное для изолированного введения нитрата натрия угнетение суммарной активности NOS меняется их гиперактивацией, что сопровождается повышением концентрации пероксинитрита. Активность аргиназы и орнитиндекарбоксилазы существенно уменьшается.

2. Функциональная активность iNOS в условиях бинарной интоксикации нитратом и фторидом натрия угнетает в мягких тканях пародонта активность ферментов аргиназного пути метаболизма L-аргинина. Введение L-аргинина в этих условиях повышает в мягких тканях пародонта активность аргиназы.
3. Введение крысам скавенджера пероксинитрита L-селенометионина и ингибитора активации NF-κB JSH-23 при моделировании бинарной интоксикации нитратом и фторидом натрия уменьшает в мягких тканях пародонта суммарную активность NOS и концентрацию пероксинитрита, увеличивает активность орнитиндекарбоксилазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Геворкян М.Л., Давтян М.А. Строение активного центра печеночной аргиназы млекопитающих. II. Субстраты и ингибиторы. Биолог. журн. Армении. 2008;(4):16-26.
2. Дробінська О., Остапченко Л., Цирюк О. та ін. Вплив L-аргініну на ураження в слизовій оболонці шлунка, спричинені серотоніном. Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2004;38:201-204.
3. Костенко В.О., Соловйова Н.В., Коваленко О.В. та ін. Механізми ауторегуляції утворення оксиду азоту в організмі ссавців та їх порушення при розвитку патологічних процесів. Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. 2011; 11(3):150-154.
4. Стасюк О.А., Костенко В.О. Зміни окиснювального метаболізму у слинних залозах щурів за умов спільного надлишкового надходження нітрату та фториду натрію. Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. 2012;12(4):167-171.
5. Храмов В.А., Листопад Г.Г. Модификация метода определения орнитина по Chinard и ее использование для количественного определения сывороточной аргиназы. Лабораторное дело. 1973; (10):591-592.
6. Храмов В.А. Простой метод определения активности орнитиндекарбоксилазы в смешанной слюне человека. Клин. лаборат. диагн. 1997;(4):14-15.
7. Шрайбман Г.Н., Дягилева Е.П., Скибина А.В. Спектрофотометрические методики определения пероксинитрита и нитрита. Вестн. КемГУ. 2011; (1): 200-206.
8. Hevel J.M. Purification of the inducible murene machrophage nitric oxide synthase. J Biol Chem. 1991; 266(34):22789-22791.
9. Kumar A., Negi G., Sharma S.S. JSH-23 targets nuclear factor-kappa B and reverses various deficits in experimental diabetic neuropathy: effect on neuroinflammation and antioxidant defence. Diabetes Obes Metab. 2011;13(8):750-758.
10. Laude K., Favre J., Thuillez C. et al. NO produced by endothelial NO synthase is a mediator of delayed preconditioning-induced endothelial protection. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003;284(6):H2053-H2060.
11. Lundberg J.O., Weitzberg E. NO-synthase independent NO generation in mammals. Biochem Biophys Res Commun. 2010;396(1):39-45.
12. Lundberg J.O., Gladwin M.T., Ahluwalia A. et al. Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics. Nat Chem Biol. 2009; 5(12):865-869.
13. Moinard C., Cynober L., de Bandt J.P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. Clin Nutr. 2005;24(2):184-917.
14. Nitrate and Nitrite in Drinking-water: Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water. – World Health Organization, 2011. – 23 p.
15. Ozer L., Elgun S., Ozdemir B., Pervane B., Ozmeric N. Arginine-nitric oxide-polyamine metabolism in periodontal disease. J Periodontol. 2011;82(2):320-328.
16. Pall M.L. The NO/ONOO-cycle as the central cause of heart failure. Int J Mol Sci. 2013;14(11):22274-22330.
17. Pautz A., Art J., Hahn S. et al. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. Nitric Oxide. 2010;23(2):75-93.
18. Szabó C., Ischiropoulos H., Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. Nat Rev Drug Discov. 2007;6(8):662-680.
19. Takeuchi K., Hatazawa R., Tanigami M. et al. Role of endogenous nitric oxide (NO) and NO synthases in healing of indomethacin-induced intestinal ulcers in rats. Life Sci. 2007;80(4):329-336.
20. Tiemann M. Fluoride in Drinking Water: A Review of Fluoridation and Regulation Issues. CRS Report for Congress Prepared for Members and Committees of Congress. – Washington, 2013. – 21 p. – [Congressional Research Service].
21. Tormanen C.D. Substrate inhibition of rat liver and kidney arginase with fluoride. J Inorg Biochem. 2003; 93(3-4):243-246.

АДРЕС ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ

Костенко Виталий Александрович

Кафедра патофизиологии ВГУЗУ «УМСА»

ул. Шевченко 23

36011, г. Полтава, Украина,

+380509151233

kostenko11111@rambler.ru

Nadesłano: 20.05.2016

Zaakceptowano: 26.07.2016