

УДК 612.11

ДИНАМИКА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ КРЫС ПОСЛЕ ЛОКАЛЬНОГО ХОЛОДОВОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ

Л. Л. Шагров, Н. А. Шутский, С. Л. Кашутин, С. И. Малявская

Северный государственный медицинский университет, Архангельск, Россия

Любой патологический процесс может отразиться на количественных и качественных особенностях состава циркулирующей крови. Этим и определяется огромное значение необходимости изучения крови в условиях локальной холодовой травмы и выявления закономерностей изменений различных показателей. Кровь в первую очередь подвергается действию токсических веществ, возникших в очаге поражения. В статье представлены результаты экспериментального исследования, целью которого было изучение изменений клеточного состава крови крыс в зависимости от времени их экспозиции в условиях локального холодового воздействия. Исследование гематологических показателей периферической крови заключалось в определении содержания нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, моноцитов, лимфоцитов. Полученные данные расширяют и углубляют представления о характере интоксикации организма в условиях стрессового воздействия различных факторов, а также свидетельствуют, что локальное холодовое воздействие влияет на активность клеток, обеспечивающих реакции неспецифического и специфического иммунного ответа, в частности, со стороны нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов.

Ключевые слова: гематологические показатели; холодовое повреждение; восстановление.

**L. L. Shagrov, N. A. Shutskiy, S. L. Kashutin, S. I. Malyavskaya.
CHANGES IN HEMATOLOGICAL PARAMETERS IN RATS AFTER LOCAL
COLD DAMAGE**

Any pathological process can affect the quantitative and qualitative composition of circulating blood. Hence the immense importance of studying blood under local cold injury and identifying the patterns of change of various indices. Blood is first and foremost affected by the toxic substances appearing in the lesion. This article presents the results of an experimental study designed to investigate changes in the cell composition of rat blood depending on the duration of exposure to local cold impact. The study of peripheral blood hematological parameters included the determination of the content of neutrophils, eosinophils, basophils, monocytes, and lymphocytes. The data obtained expand and deepen our understanding of the nature of intoxication under various stresses, and also indicate that local cold exposure affects the activity of the cells engaged in non-specific and specific immune response, in particular neutrophils, monocytes, and lymphocytes.

Keywords: hematological parameters; cold damage; recovery.

Введение

Изучение механизмов адаптации организма человека к жизни в северных широтах, где он подвергается воздействию низких природных температур, диктуется необходимостью освоения Крайнего Севера [Саввинов, 2005; Николаев, 2007]. Известно, что в ответ на воздействие абсолютно дискомфортных факторов окружающей среды происходят изменения в функционировании основных жизнеобеспечивающих систем: иммунной, нервной, эндокринной [Казначеев, 1980; Петров, 1982; Хаитов, 1995; Агаджанян, 2005]. При длительном и/или чрезвычайно сильном воздействии неблагоприятных факторов происходят сдвиги в иммунной системе, проявляющиеся изменениями пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток, а также аутосенсбилизации, что в конечном итоге приводит к истощению резервов и нарушению компенсаторных возможностей [Добродеева, 2004; Саввинов, 2005].

В связи с этим представляет интерес изучение реактивных сдвигов в гемограммах в условиях воздействия локального холодового повреждения. Ранее проведенные исследования касались в основном изучения содержания нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов без учета дифференцировки данных клеток на субпопуляции [Marks, 1969; Gadarowski, 1984; Konnov, 2016].

Изучение сегментограммы, моноцитограммы и лимфоцитограммы позволяет оценить уровень сегментации ядра нейтрофилов, активность пролиферации и дифференцировки моноцитов, а также лимфопролиферацию лимфоцитов. Естественно полагать, что количественный анализ форменных элементов крови с учетом их субпопуляций за более длительный период изучения после отморожения создаст целостную картину, позволяющую определить реализацию резервных и компенсаторных возможностей.

Материалы и методы

Эксперимент проводили в соответствии с Правилами лабораторной практики (Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики»), а также с учетом требований Международной Хельсинкской конвенции о гуманном отношении к животным (1972).

Холодовую травму воспроизводили на беспородных самцах и самках крыс 2-месячного возраста, массой 180–200 г, содержащихся в одинаковых условиях, на стандартном пище-

вом режиме. После наступления наркотического сна моделировали контактное отморожение с помощью металлической гирьки диаметром 2,5 см, которую предварительно охлаждали в жидком азоте, а потом прикладывали к депилированной коже спины крысы на 3 мин по методу, описанному в работе [Бойко, 2010]. В результате такого воздействия у экспериментальных животных развивалось локальное отморожение 3-й степени.

Вывод из эксперимента проводили путем передозировки средства для наркоза на 3, 7, 14 и 21-е сутки. Для получения статистически достоверных результатов группы формировали из 20 животных. В качестве контрольной группы использованы беспородные крысы той же массы тела, содержащиеся в тех же условиях, что и опытная группа. Крыс декапитировали с соблюдением требований гуманности согласно Приложению № 4 «О порядке проведения эвтаназии (умерщвления) животного» к Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных (приложение к Приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977). Пробы крови были получены во время декапитации животных.

Количество лейкоцитов определяли в камере Горяева по стандартному методу. На мазке крови, зафиксированном смесью Никифорова и окрашенном по Романовскому – Гимзе, определяли содержание нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, моноцитов, лимфоцитов. Цитоскопическое исследование нейтрофильных лейкоцитов проводили путем подсчета среднего количества фрагментов ядра у 100 клеток [Тодоров, 1968]. При изучении моноцитограммы учитывали промоноциты, собственно моноциты и полиморфноядерные моноциты [Фрейдлин, Тотолян, 2001]. При изучении лимфоцитограммы дифференцировали лимфоциты по величине клетки с учетом размеров цитоплазмы: малые лимфоциты – до 8 мкм, средние – от 8 до 12 мкм, большие – больше 12 мкм [Шерстенникова и др., 2017].

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью SPSS 13.0 for Windows. Распределение параметров было ненормальным, в связи с чем описание выборок проводили с помощью подсчета медианы (Md) и межквартильного интервала Q25–Q75. Вероятность различий оценивали по непараметрическому критерию Колмогорова – Смирнова.

Результаты и обсуждение

В результате эксперимента установлено, что показатели клеточного состава крови

у контрольной группы животных, содержащихся при оптимальных температурных условиях, не сопровождались отклонениями от нормы, в то время как при оценке состояния экспериментальных групп крыс выявлены изменения показателей количества форменных элементов.

Результаты исследования свидетельствуют, что холодовое воздействие влияет на активность клеток, обеспечивающих реакции неспецифического и специфического иммунного ответа. Так, отмечено незначительное снижение общего количества лейкоцитов крови на 3-и сутки (1,12 %), а на 21-е сутки оно соответствует показателю у контрольной группы.

При этом количество лимфоцитов снижается на 6 % на 3–7-е сутки, максимально возрастая на 21-е сутки на 10,5 %. Изменения со стороны гранулоцитов (эозинофилов, нейтрофилов и базофилов) наблюдались только у нейтрофилов – на 3-и и 7-е сутки отмечено повышение на 16,5 %, на 21-е сутки их количество соответствует показателю у контрольной группы (рис.). При этом количество моноцитов на 3-и и 7-е сутки снижается (на 16 %), несмотря на то что на 14-е сутки отмечается незначительное повышение (на 2 %) и резкое снижение на 21-е сутки (на 8 %) по сравнению с контролем.

При изучении сегментограммы произошли следующие изменения (рис., Б). В группе контроля преобладали нейтрофилы, содержащие 5 и более сегментов в ядре, – 96,0 %. На 3-и сутки после локального холодового повреждения регистрировали статистически значимое снижение концентрации нейтрофилов с 5 сегментами в ядре на 48,5 % и увеличение 3- и 4-сегментных форм на 14,5 и 24 % соответственно. Статистически значимых различий между формами с 1, 2, 3 и 4 сегментами в ядре на 7–14-е сутки не выявлено, тогда как концентрация 5-сегментных форм увеличилась на 7-е сутки на 24,5 % и незначительно снизилась на 14-е сутки (4 %). Содержание нейтрофилов с 1 и 2 сегментами в ядре на 21-е сутки соответствовало значению у группы контроля, нейтрофилы с 3 и 4 сегментами в ядре сохраняли высокие концентрации 2 и 7,5 %, уровень нейтрофилов с 5 сегментами в ядре продолжал восстанавливаться до близкого к контролю значения.

При изучении структуры моноцитограммы наблюдали следующие изменения: на 3-и сутки незначительно снижается количество промоноцитов и собственно моноцитов на 2 %, при этом увеличивается содержание полиморфноядерных моноцитов на 3 %. С 7-х по 21-е сутки каких-либо существенных колебаний в структу-

ре моноцитограммы со стороны промоноцитов и полиморфноядерных моноцитов не зарегистрировано. Количество собственно моноцитов с 3-х по 21-е сутки статистически значимо увеличивается на 4 %.

Структура лимфоцитограммы показала отсутствие каких-либо изменений со стороны уровня среднеплазменных лимфоцитов после локального холодового повреждения. Изменения касались малых и больших лимфоцитов.

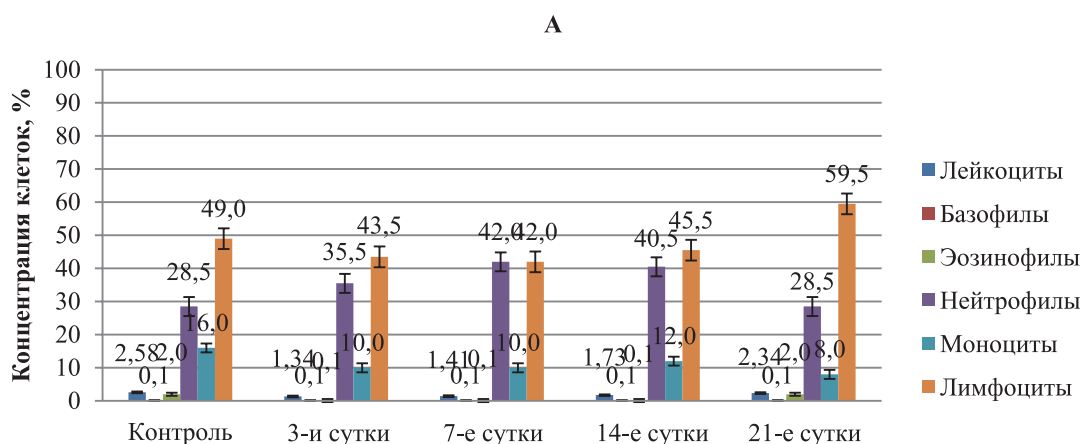
Так, на 3-и сутки регистрировали увеличение содержания малых лимфоцитов на 18 % на фоне снижения уровня больших форм на 14 %. На 7–14-е сутки проявилась обратная динамика: уровень малых лимфоцитов снизился, а больших форм – увеличился, что не отразилось на общем содержании лимфоцитов. На 21-е сутки увеличение общего содержания лимфоцитов было связано с существенным увеличением малых лимфоцитов на 8 %, несмотря на снижение больших форм на 4,5 % по сравнению с группой контроля.

Накопленный в настоящее время фактический материал показывает, что ранее проведенные исследования касались в основном изучения содержания нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов без учета дифференцировки данных клеток на субпопуляции [Marks, 1969; Gadarowski, 1984; Konnov, 2016].

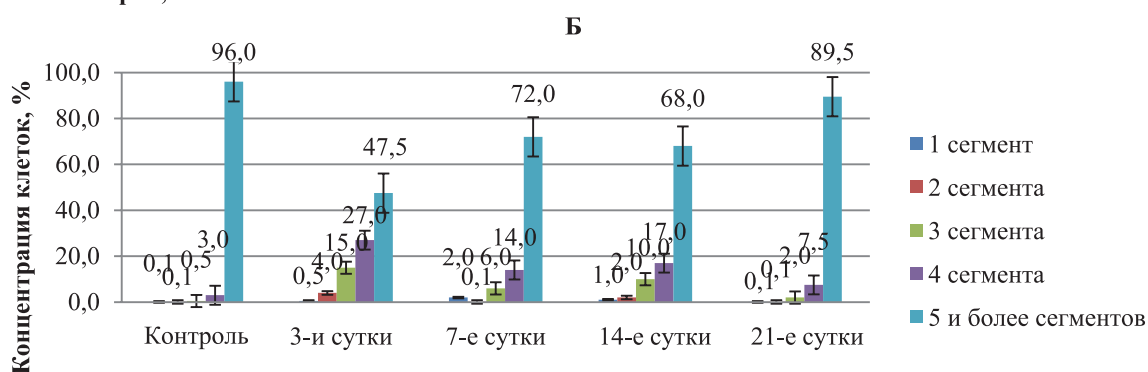
Количественный анализ форменных элементов крови с учетом их субпопуляций за более длительный период изучения после отморозения показал: снижение общего количества лейкоцитов на 3-и сутки указывает на то, что холодовое воздействие действительно является стрессовым фактором для теплокровных животных. Это коррелирует с исследованиями Е. Г. Костоломовой, где показано, что популяции изолированных ИКК по-разному реагируют на длительность холодовой экспозиции [Костоломова, 2011]. Кратковременное охлаждение является фактором, активирующим функциональную активность моноцитов и нейтрофилов, а длительное – угнетающим. В исследованиях В. М. Николаева также отмечалось, что при адаптации крыс к гипотермии изменяются показатели неспецифического клеточного иммунитета, связанные с фагоцитарной активностью лейкоцитов [Николаев, 2007].

Будем полагать, что экспозиция крыс в нашем эксперименте в течение 3–21 суток, имеющая в результате подавление активности лейкоцитов, являлась достаточно длительной.

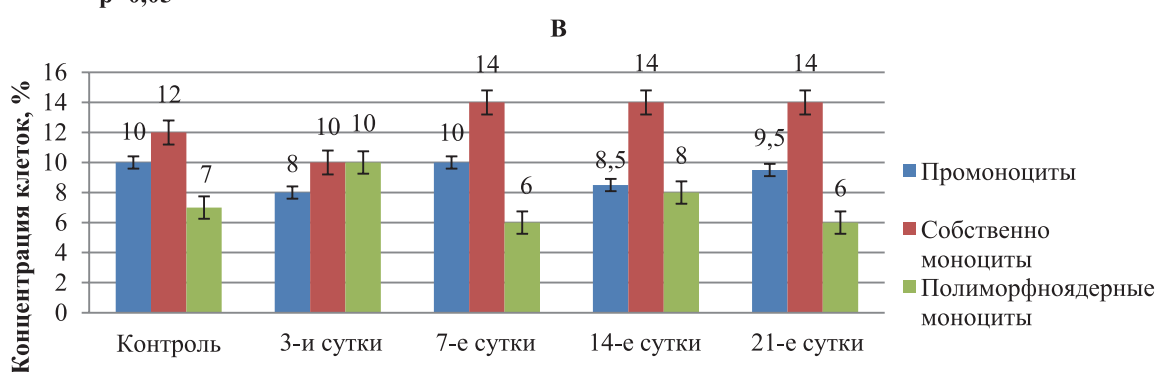
Анализ сегментограммы (рис., Б) показал, что в физиологических условиях основными нейтрофилами крови крыс являются 5-сегментные формы.



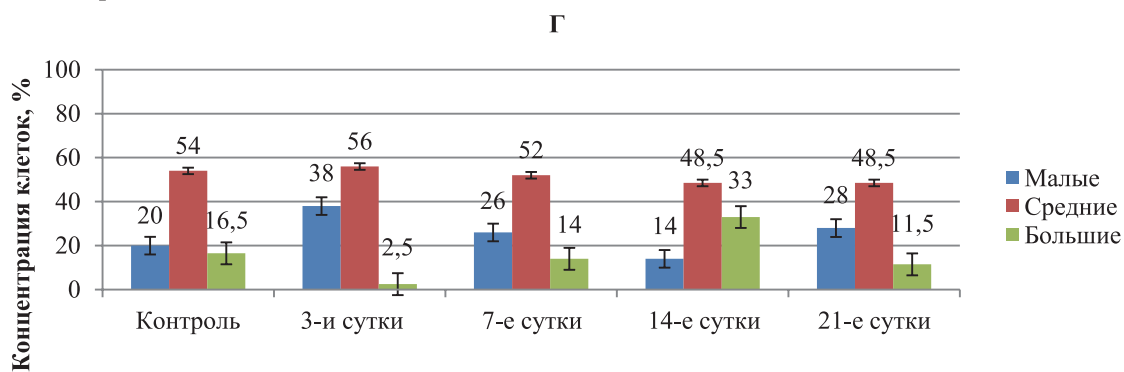
*p<0,05



*p<0,05



*p<0,05



*p<0,05

Динамика гематологических показателей и показателей (кл./л) лейкограммы (А), сегментограммы (Б), моноцитограммы (В) и лимфоцитограммы (Г) крови крыс после локального холодового повреждения
 Dynamics of the hematological parameters and of indicators (cells/l) of leukogram (A), segmentogram (Б), monocyto-gram (B) and lymphocytogram (Г) of rat blood after local cold injury

По мнению П. Д. Горизонтова, сегментоядерные нейтрофилы являются одним из факторов неспецифической резистентности, так как обеспечивают фагоцитоз в тканях и на поверхностях слизистых, синтезируют комплемент, лизоцим, миелопероксидазу и катионные белки. Как видно из фрагмента Б рисунка, происходило статистически значимое увеличение 1-, 2-, 3- и 4-сегментных форм на фоне снижения 5-сегментоядерных нейтрофилов на 3-и сутки после холодового повреждения, тем самым можно предполагать об усиленной миграционной активности 5-сегментных форм и дополнительном рекрутировании менее сегментированных форм нейтрофилов из красного костного мозга [Горизонтов, 1983].

При изучении активности и пролиферации моноцитов (рис., В) отмечено увеличение концентрации собственно моноцитов на фоне снижения уровня промоноцитов, что позволяет предположить об усиленном формировании именно той популяции моноцитов, которая способна выполнять специализированные функции. В свою очередь, снижение содержания полиморфноядерных форм моноцитов может свидетельствовать об усиленной их миграции в зону повреждения.

Вместе с тем следует отметить, что сдвиги представленных гематологических изменений со стороны нейтрофилов и моноцитов будут различными при разных вариантах моделирования – в зависимости от силы стрессора и длительности его действия, а также от функционального состояния экспериментального животного. Что в конечном итоге может проявляться в виде формирования других соотношений различных видов клеток в периферической крови. Так, при умеренном по силе раздражителе гематологическая картина проявляется в виде увеличения количества нейтрофилов, моноцитов. При чрезмерно сильном стрессовом воздействии развивается абсолютная лимфопения, абсолютная моноцитопения, абсолютный нейтрофилез [Шилова, 2011].

Анализ лимфоцитограммы (рис., Г) показал статистически значимые колебания концентраций малых и больших лимфоцитов после локального холодового повреждения, при этом отсутствовали какие-либо реакции со стороны среднеплазменных лимфоцитов. Данные изменения указывают на основную роль малых и больших лимфоцитов в восстановительном периоде.

Как отмечает А. А. Савченко, увеличение содержания больших лимфоцитов является результатом бласттрансформации, а малые лимфоциты составляют основную часть недифференцированных лимфоцитов, способных экс-

прессировать рецепторы CD34, что и характеризует их как стволовые клетки [Савченко, 1996].

С 3-х по 14-е сутки изменения соотношения между малыми и большими лимфоцитами не связаны с увеличением общего числа лимфоцитов. Увеличение на 21-е сутки общего содержания лимфоцитов происходило за счет возрастания их малых форм, что позволяет предполагать о наиболее активном рекрутировании малых лимфоцитов, как стволовых клеток крови, необходимых для восстановления поврежденных тканей.

Заключение

Анализируя вышеизложенное, можно утверждать, что холодовое воздействие является стрессом, выражающимся в реакции со стороны всего клеточного состава крови. В результате действия холодового фактора стимулируется специфический иммунный ответ, на что указывает увеличение в крови количества лимфоцитов, а реакции неспецифического ответа, опосредованные другими видами лейкоцитов, подавляются.

Литература

- Агаджанян Н. А. Стресс и теория адаптации. Оренбург: ОГУ, 2005. С. 60–94.
- Бойко В. В. Изучение морфологических особенностей в тканях экспериментальных животных при моделировании холодовой травмы // Вестник морфологии. 2010. № 16(3). С. 526–528.
- Горизонтов П. Д., Белоусова О. И., Федотова М. И. Стресс и система крови. М.: Медицина, 1983. 240 с.
- Добродеева Л. К., Жилина Л. П. Иммунологическая реактивность, состояние здоровья населения Архангельской области. Екатеринбург: УрО РАН, 2004. 230 с.
- Казначеев В. П. Современные аспекты адаптации. Новосибирск: Наука, 1980. 190 с.
- Костоломова Е. Г. Сопряженность иммунофизиологических реакций макроорганизма и изолированных иммунокомпетентных клеток при различных режимах криовоздействия: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2011. 171 с.
- Николаев В. М. Изменения прооксидантно-антиоксидантного равновесия в ответных эколого-биохимических реакциях организма животных и человека на действие холода: дис. ... канд. биол. наук. Якутск, 2007. 112 с.
- Петров Р. В. Иммунология. М.: Медицина, 1982. 636 с.
- Саввинов Д. Д. Среда обитания и здоровье человека на Севере. Новосибирск: Наука, 2005. 100 с.
- Савченко А. А. Метаболические особенности лимфоцитов крови у людей с нарушениями иммунореактивности, проживающих в разных климато-ге-

ографических условиях: автореф. дис. ... докт. мед. наук. Томск, 1996. 30 с.

Сапин М. Р., Никитюк Д. Б. Иммунная система, стресс и иммунодефицит. М.: Джангар, 2000. 184 с.

Тодоров Й. Т. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. София: 6-е рус. изд-во, 1968. 784 с.

Фрейдлин И. С., Тотолян А. А. Клетки иммунной системы. СПб.: Наука, 2001. 390 с.

Хаитов Р. М., Пинегин Б. В., Истамов Х. И. Экологическая иммунология. М.: ВНИРО, 1995. 219 с.

Шерстенникова А. К., Кашутин С. Л., Николаев В. И., Хлопина И. А. Уровень экспрессии молекул адгезии на лимфоцитах в зависимости от размеров их цитоплазмы // Клиническая лабораторная диагностика. 2017. № 3. С. 42–44.

Шилова Ю. А. Влияние пропранолола гидрохлорида при остром стрессе на фагоцитарную

активность лейкоцитов периферической крови // Успехи современного естествознания. 2011. № 8. С. 144–145.

Gadarowski J. J. Jr., Esce J. D. Acute systemic changes in blood cells, proteins, coagulation, fibrinolysis, and platelet aggregation after frostbite injury in the rabbit // *Cryobiology*. 1984. Vol. 21(3). P. 359–370.

Konnov V. A., Shapovalov K. G. Lymphocyte-platelet interactions in patients with deep frostbites with various nutritional statuses // *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* 2016. Vol. 60(3). P. 52–56.

Marks R., Lim C. C., Borrie P. F. A pernicious syndrome with monocytosis and neutropenia: a possible association with a preleukaemic state // *Br. J. Dermatol.* 1969. May. Vol. 81(5). P. 327–332 p.

Поступила в редакцию 13.06.2019

References

Agadzhanyan N. A. Stress i teoriya adaptatsii [Stress and theory of adaptation]. Orenburg: OGU, 2005. P. 60–94.

Boiko V. V. Izuchenie morfologicheskikh osobennostei v tkanyakh eksperimental'nykh zhyvotnykh pri modelirovanii kholodovoi travmy [The study of morphological features in the tissues of experimental animals in the simulation of cold injury]. *Vestnik morfologii* [Herald Morphology]. 2010. No. 16(3). P. 526–528.

Dobrodeeva L. K., Zhilina L. P. Immunologicheskaya reaktivnost', sostoyanie zdorov'ya naseleniya Arkhangel'skoi oblasti [Immunological reactivity, state of health of the population of the Arkhangelsk Region]. *Ekaterinburg: Ural Br. of RAS*, 2004. 230 p.

Freidlin I. S., Totolyan A. A. Kletki immunnoi sistemy [Cells of the immune system]. St. Petersburg: Nauka, 2001. 390 p.

Horizontov P. D., Belousova O. I., Fedotova M. I. Stress i sistema krovi [Stress and blood system]. Moscow: Meditsina, 1983. 240 p.

Kaznacheev V. P. Sovremennyye aspekty adaptatsii [Contemporary aspects of adaptation]. Novosibirsk: Nauka, 1980. 190 p.

Khaitov R. M., Pinegin B. V., Istamov H. I. Ekologicheskaya immunologiya [Ecological immunology]. Moscow: VNIRO Publ., 1995. 219 p.

Kostolomova E. G. Sopryazhennost' immunofiziologicheskikh reaktsii makroorganizma i izolirovannykh immunokompetentnykh kletok pri razlichnykh rezhimakh kriovozdeistviya [Conjugation of immunophysiological reactions of a macroorganism and isolated immunocompetent cells under various modes of cryotherapy]: PhD (Cand. of Biol.) thesis. Moscow, 2011. 171 p.

Nikolaev V. M. Izmeneniya prooksidantno-antioxidantnogo ravnovesiya v otvetnykh ekologo-biokhimi-cheskikh reaktsiyakh organizma zhyvotnykh i cheloveka na deistvie kholoda [Changes in the prooxidant-antioxidant balance in the response of the ecological and biochemical reactions of the organism of animals and humans to the action of cold]: PhD (Cand. of Biol.) thesis. Yakutsk, 2007. 112 p.

Petrov R. V. Immunologiya [Immunology]. Moscow: Meditsina, 1982. 636 p.

Sapin M. R., Nikityuk D. B. Immunnaya sistema, stress i immunodefitsit [Immune system, stress, and immunodeficiency]. Moscow: Dzhangar, 2000. 184 p.

Savchenko A. A. Metabolicheskie osobennosti limfotsitov krovi u lyudei s narusheniyami immunoreaktivnosti, prozhivayushchikh v raznykh klimato-geograficheskikh usloviyakh [Metabolic features of blood lymphocytes in people with immunoreactivity disorders, living in different climatic and geographical conditions]: Summary of DSc (Dr. of Med.) thesis. Tomsk, 1996. 30 p.

Savinov D. D. Sreda obitaniya i zdorov'e cheloveka na Severe [Habitat and human health in the North]. Novosibirsk: Nauka, 2005. 100 p.

Sherstennikova A. K., Kashutin S. L., Nikolaev V. I., Khlopin I. A. Uroven' ekspressii molekul adgezii na limfotsitakh v zavisimosti ot razmerov ikh tsitoplazmy [The level of expression of adhesion molecules on lymphocytes, depending on the size of their cytoplasm]. *Klinicheskaya lab. diagnostika* [Clinical Lab. Diagnosis]. 2017. No. 3. P. 42–44.

Shilova Yu. A. Vliyaniye propranolola gidrokhlorida pri ostrom stresse na fagotsitarnuyu aktivnost' leukotsitov perifericheskoi krovi [The effect of propranolol hydrochloride in acute stress on the phagocytic activity of peripheral blood leukocytes]. *Uspekhi sovr. estestvoznaniya* [Advances in Current Nat. Sci.]. 2011. No. 8. P. 144–145.

Todorov Y. T. Klinicheskie laboratornye issledovaniya v pediatrii [Clinical laboratory studies in pediatrics]. Sofia: 6th Russian ed., 1968. 784 p.

Gadarowski J. J. Jr., Esce J. D. Acute systemic changes in blood cells, proteins, coagulation, fibrinolysis, and platelet aggregation after frostbite injury in the rabbit. *Cryobiology*. 1984. Vol. 21(3). P. 359–370.

Konnov V. A., Shapovalov K. G. Lymphocyte-platelet interactions in patients with deep frostbites with various nutritional statuses. *Patol. Physiol. Exp. Ter.* 2016. Vol. 60(3). P. 52–56.

Marks R., Lim C. C., Borrie P. F. A pernicious syndrome with monocytosis and neutropenia: a possible association with a preleukaemic state. *Br. J. Dermatol.* 1969. May. Vol. 81(5). P. 327–332.

Received June 13, 2019

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Шагров Леонид Леонидович

младший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории Северный государственный медицинский университет пр. Троицкий, 51, Архангельск, Россия, 163000
эл. адрес: leonidshagrov@mail.ru
тел.: +79506608685

Шутский Никита Алексеевич

лаборант-исследователь центральной научно-исследовательской лаборатории Северный государственный медицинский университет пр. Троицкий, 51, Архангельск, Россия, 163000
эл. адрес: nikitashutskijj@rambler.ru
тел.: +79009204623

Кашутин Сергей Леонидович

заведующий кафедрой кожных и венерических болезней, д. м. н.
Северный государственный медицинский университет пр. Троицкий, 51, Архангельск, Россия, 163000
эл. адрес: sergeycash@yandex.ru
тел.: +79062812390

Малявская Светлана Ивановна

проректор по научно-инновационной работе, д. м. н., проф.
Северный государственный медицинский университет пр. Троицкий, 51, Архангельск, Россия, 163000
эл. адрес: malyavskaya@yandex.ru
тел.: +79214809546

CONTRIBUTORS:

Shagrov, Leonid

Northern State Medical University
51 Troitskiy Ave., 163000 Arkhangelsk, Russia
e-mail: leonidshagrov@mail.ru
tel.: +79506608685

Shutskiy, Nikita

Northern State Medical University
51 Troitskiy Ave., 163000 Arkhangelsk, Russia
e-mail: nikitashutskijj@rambler.ru
tel.: +79009204623

Kashutin, Sergey

Northern State Medical University
51 Troitskiy Ave., 163000 Arkhangelsk, Russia
e-mail: sergeycash@yandex.ru
tel.: +79062812390

Malyavskaya, Svetlana

Northern State Medical University
51 Troitskiy Ave., 163000 Arkhangelsk, Russia
e-mail: malyavskaya@yandex.ru
tel.: +79214809546