

Сведения об авторах:

Корочкина Ольга Владимировна, д-р мед. наук проф., зав. каф. инфекционных болезней ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия; **Собчак Девора Михайловна**, д-р мед. наук, доцент каф. инфекционных болезней ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия; **Соболевская Оксана Львовна**, д-р мед. наук, доцент каф. инфекционных болезней ГБОУ ВПО Нижегородская государственная

медицинская академия; **Бутина Татьяна Юрьевна**, врач клинической лабораторной диагностики ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н.Блохиной» Роспотребнадзора; **Кузнецова Ирина Васильевна**, врач клинической лабораторной диагностики ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н.Блохиной» Роспотребнадзора; **Корейво Елена Германовна**, канд. мед. наук, врач ООО «Клиника современных технологий "Садко"».

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.36-004-06:616.36-002.2-022.6]-078.33

Попов А.Ф., Михайлов А.О., Иванова Н.С., Симакова А.И.

МЕТОД ДНК-КОМЕТ В ДИАГНОСТИКЕ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВИРУСНОМ ГЕПАТИТЕ С

ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 690002, г. Владивосток, просп. Острякова, 2, Россия

В исследовании приняли участие 100 человек, которые были разделены на 6 групп в зависимости от выраженности фиброза печени по данным эластометрии: 1-я – F0, 2-я – F1, 3-я – F2, 4-я – F3, 5-я – F4. 6-ю (контрольную) группу составили 43 здоровых добровольца. Проведенное исследование показало взаимосвязь между стадией выраженности фиброза и степенью деструкции ДНК лимфоцитов периферической крови. Максимально процесс деструкции ДНК лимфоцитов периферической крови установлен у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С с исходом в цирроз. Это позволило рассматривать метод ДНК-комет как перспективный дополнительный вспомогательный метод в оценке формирования фиброза печени.

Ключевые слова: гепатит; цирроз; ДНК; апоптоз.

Для цитирования: Эпидемиология и инфекционные болезни. 2015. 20 (2): 29–33.

Popov A.F., Mikhailov A.O., Ivanova N.S., Simakova A.I.

METHOD OF DNA-COMET ASSAY IN THE DIAGNOSIS OF LIVER FIBROSIS C IN PATIENTS WITH CHRONIC VIRAL HEPATITIS C Pacific State Medical University, 2, Ostryakova Pr., Vladivostok, Russian Federation, 690002

In the study there were included 100 patients, which were selected in 5 group in dependence on the degree of liver fibrosis: I – F0, II – F1, III – F2, IV – F3, V – F4. Sixth (control) group was consisted of 43 healthy volunteers. The performed research has shown the relationship between the stage of fibrosis and the degree of DNA degradation in peripheral blood lymphocytes. The biggest level of DNA destruction in peripheral blood lymphocytes was established in group V patients with chronic viral hepatitis C. This allowed to consider method of DNA-comet assay as promising auxiliary method in the assessment of the formation of liver fibrosis.

Key words: hepatitis; cirrhosis; DNA; apoptosis.

Citation: *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni. 2015; 20(2): 29–33. (In Russ.)*

Метод ДНК-комет был впервые предложен в 1984 г. Ostling и Johanson. На агарозный гель, нанесённый на предметные стёкла, помещали культуры клеток млекопитающих, затем их лизировали в гипертоническом растворе соли с детергентом. После этого образцы подвергали электрофорезу в нейтральных условиях, где освобождённая ДНК, в которой содержались двунитевые разрывы, мигрировала по направлению к аноду. Для визуализации генетического материала препараты окрашивали бромидом этидия и микроскопировали, анализируя структуры, похожие на кометы с «головой» из клубка ДНК и «хвостом» из мигрировавшей ДНК,

на фотометре микроскопа [1]. Позже N. Singh и соавт. [2] было предложено проводить электрофорез в щелочной среде (pH>13,0), что позволяло оценить не только двунитевые разрывы, но и однострунные и щелочелабильные сайты. В 1990 г. P. Olive и соавт. [3] предложили ещё одну модификацию процедуры с pH ~ 12,3. Этот вариант оказался более чувствительным к оценке генотоксичности, так как генотоксиканты индуцировали одно- и двунитевые разрывы и появление щелочелабильных сайтов.

В медицине метод комет использовали для изучения генотоксического влияния органических соединений [4], состояния ДНК малигнизированных клеток при раке шейки матки [5], эндометрия [6]. Особый интерес представляли лимфоциты как объект для изучения ввиду их относительно лёгкой доступности по сравнению с другими клетками че-

Для корреспонденции: **Попов Александр Федорович**, доктор мед. наук, проф., проф. каф. инфекционных болезней, e-mail: doctor.popov@mail.ru

Таблица 1

Демографическая характеристика больных хроническим вирусным гепатитом С по группам в зависимости от стадии фиброза печени

Показатель	Группа					
	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я	6-я
Количество человек	19	21	20	17	23	43
Средний возраст	48 ± 17	47 ± 14	43 ± 15	38 ± 12	47 ± 12	39 ± 12
Количество мужчин/женщин в группе	9/10	10/11	12/8	10/7	11/12	25/18

ловека. Состояние их ДНК изучали у курильщиков [7], больных сахарным диабетом [8] и при тяжёлой сочетанной травме [9]. Результаты исследований помогли учёным установить роль деструкции ДНК в патогенетических процессах при данных состояниях, а также оценить тяжесть и выраженность патологических процессов у больных. Так, S. Shawkі и соавт. [10] указали на патогенетически значимую роль повреждений ДНК в эволюции гепатоцеллюлярной карциномы. Деструкция ДНК показывает интенсивность внутриклеточного оксидативного и нитрооксидативного стресса, которые могут запустить мутагенез и раковую трансформацию, что подчёркивает необходимость оптимизации терапии для уменьшения степени ДНК-повреждений.

Вопрос, затрагивающий зависимость уровня повреждений ДНК в лимфоцитах от степени выраженности гистопатологических изменений в печени, до сих пор не изучен. Имеются противоречивые данные – одни авторы [11, 12] её подтверждают, указывая на значимую роль окислительного стресса, особенно возрастающего при исходе в цирроз, другие – отвергают [13, 14]. Такая противоречивость и послужила поводом для нашего исследования.

Цель работы – изучить количество одно- и двунилевых разрывов ДНК-лимфоцитов, выделенных от больных хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС) в зависимости от степени выраженности фиброза по данным эластометрии печени.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие пациенты инфекционного отделения ГБУЗ «Краевая клиническая больница» №2 и ГБУЗ «Краевая клиническая инфекционная больница» – 100 человек за период 2012–2014 гг. Контрольную группу составили 43 добровольца без сопутствующих хронических заболеваний органов кровообращения и почек, сопоставимые по полу и возрасту с основной группой и у которых не определялись маркёры вирусных гепатитов в крови (табл. 1).

Возраст больных колебался от 25 до 79 лет, средний возраст составил 43 ± 14 лет; количество мужчин – 51, женщин – 49. Все исследуемые были разделены на 6 групп: 1-я - пациенты со степенью фиброза F0 (n=19), 2-я - пациенты со степенью фиброза F1 (n= 21), 3-я - пациенты со степенью фибро-

за F2 (n=20), 4-я - пациенты со степенью фиброза F3 (n=17), 5-я - пациенты со степенью фиброза F4 (n=23), 6-я - контрольная группа (n = 43).

Критериями включения пациентов в группу были наличие подтверждённого методом ИФА гепатита С с давностью заболевания более 6 мес, идентифицированного генотипа 1 и установленного количества вируса в крови методом ПЦР. Степень выраженности фиброза печени определяли на аппарате FibroScan по классификации METAVIR. Биохимическую активность при гепатите устанавливали на основании лабораторных синдромов мезенхимального воспаления, цитолиза, холестаза. Критериями исключения служили: признаки хронической артериальной недостаточности, ишемическая болезнь сердца, сердечная недостаточность, сахарный диабет, пациенты с другими инфекционными заболеваниями и сопутствующими заболеваниями внутренних органов в стадии обострения, беременные, пациенты с психическими заболеваниями, курильщики. Все больные получали стандартную патогенетическую терапию ХВГС.

Исследование проб крови проводили однократно – при поступлении у пациентов забирали 2 мл цельной крови в пробирки, содержащие антикоагулянт. Выделение лимфоцитов проводили поэтапным методом с использованием градиента фиколлурографина (ρ=1,077 г/см³) в стерильных условиях (Boyum,1968). Цельную кровь, разведенную питательной средой 199 (1:2), наслаивали на раствор

Таблица 2

Характеристика изменений в ДНК лимфоцитов периферической крови в зависимости от фиброза печени у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С (1 – 5-я группы) и здоровых добровольцев (6-я группа)

Показатель	Группа					
	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я	6-я
% ДНК в хвосте кометы	13 ± 3,3	18 ± 3	25 ± 5,1*	57 ± 6,3*	68,4 ± 10,3*	12 ± 5
Количество повреждённых клеток, %	36*	42*	40*	64*	67*	20
Апоптотические клетки (число в 100 полях зрения)	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	2 ± 1	5 ± 1*	1 ± 1
Некротические клетки (число в 100 полях зрения)	0	0	0	0	0	0

*p < 0,05 в сравнении с контрольной группой.

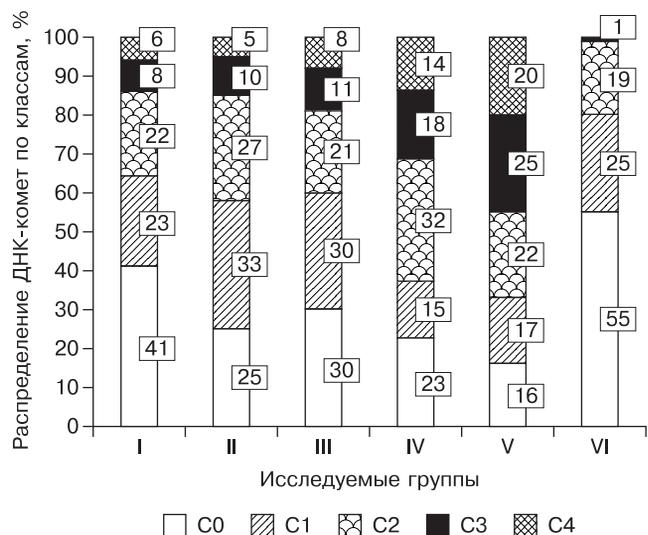


Рис. 1. Степень деструкции ДНК-лимфоцитов периферической крови, выраженная в классах ДНК-комет.

фиколл-урографина и центрифугировали при комнатной температуре в центрифуге с горизонтальным ротором при 2000 оборотах/мин в течение 30 мин. Выделенные клетки трижды отмывали средой 199, центрифугуя по 10 мин при 1000 оборотов/мин.

Оценку степени повреждения ДНК проводили щелочной модификацией метода ДНК-комет (P. Olive [3]). Отмытые лимфоциты (50 мкл) смешивали с 500 мкл 1% раствора легкоплавкой агарозы («Sigma»), приготовленной на фосфатно-солевом буфере при температуре 37° С до финальной концентрации 10⁴ клеток/мл. Затем 60 мкл клеточной суспензии наносили на слайды, предварительно покрытые нормоплавкой агарозой («Sigma») и накрывали покровными стёклами. Слайды для застывания агарозы хранили 5 мин при температуре 4° С. После затвердевания агарозы снимали покровные стекла и помещали препараты в холодный (4° С) лизирующий буфер (10 мМ Tris-HCl, pH 10,0, 2,5 мМ NaCl, 100 мМ EDTA-Na₂, 1% Triton X-100, 10% ДМСО) на 1 ч при 4° С. По окончании лизиса препараты помещали в камеру для электрофореза, содержащую щелочной буфер (300 мМ NaOH, 1 мМ EDTA-Na₂) на 40 мин. Далее проводили электрофорез при напряжении 20 В и силе тока 300 мА в течение 25 мин. Слайды после электрофореза трижды по 5 мин обрабатывали нейтральным буфером (0,4 М Tris-HCl pH 7,5), затем дегидратировали метанолом и красили раствором бромида этидия (2 мкг/мл). Препараты ДНК просматривали на флюоресцентном микроскопе Zeiss при увеличении в 200 раз. Полученные изображения анализировали с помощью программы Comet Score. Анализу подвергались не менее 100 клеток каждого препарата. Для степени повреждения ДНК использовали показатель содержания ДНК в хвосте комет (% DNA t %) и процент повреждённых клеток, который рассчитывали по формуле $(C2+C3+C4) / (C0+C1+C2+C3+C4) \cdot 100\%$. Апоптотические клетки идентифицировали как специфичные ДНК-кометы с диффузным «хвостом» и практически отсутствующей «головой», некротические клетки определяли как широкие рыхлодиффузные ДНК-кометы неправильной формы. Классифицировали кометы по классам в зависимости от показателя % ДНК в «хвосте» следующим образом: C0 – 0 - 20%, C1 – 24 - 40%, C2 – 41 - 60%, C3 – 61 - 80%, C4 – 81 - 100%. Статистическую обработку проводили с помощью программы WinStat.

Результаты и обсуждение

Результаты и обсуждение

Щелочная модификация метода ДНК-комет позволила оценить количество одно- и двунитевых разрывов, а также подсчитать популяцию лимфоцитов, погибших путём апоптоза. Оценивая полученные результаты по критерию % ДНК в «хвосте» кометы, было установлено, что уровень показателей изменялся от группы к группе в зависимости от степени выраженности фиброза (табл. 2).

Из таблицы следует, что при фиброзе F2 - F4 (3 – 5-я группы) наблюдались наиболее выраженные изменения по сравнению с таковыми в контрольной группе ($p < 0,05$).

Обсуждая механизмы повреждения ДНК-лимфоцитов, следует учесть, что ведущее место занимает окислительный стресс, который, как известно, присутствует при ХВГС с генотипом 1 [15, 16]. Возрастающая интенсивность процессов окисления с увеличением степени фиброза и других системных изменений в организме пациентов усиливает повреждение ДНК не только лимфоцитов, но и других клеток. А деструктивная ДНК – прямой путь к канцерогенезу и раковому перерождению клетки [10, 12].

На рис. 1, 2, а, б, в, г, д, е отражены преобладающие классы ДНК-комет в исследуемых группах, где наблюдалась следующая картина: в 1-й и 6-й группах преобладали кометы класса C0, во 2-й и 3-й группах - C1, в 4-й группе - C2, в 5-й группе - C3. Также прослеживается постепенное увеличение доли повреждённых клеток от 20% в контрольной группе до 67% в группе больных циррозом печени в исходе ХВГС (см. табл. 2). Такое распределение свидетельствует об усиливающейся деструкции ДНК лимфоцитов в зависимости от степени фиброза в печени.

Также следует отметить, что во всех группах присутствовали апоптотические клетки в единичном количестве, однако в 5-й группе их количество было достоверно больше по сравнению со всеми остальными группами (см. табл. 2). Некротических клеток не было зарегистрировано ни в одной группе.

Таким образом, полученные результаты совпадают с имеющейся информацией об увеличении интенсивности апоптоза при хроническом вирусном гепатите на стадии цирроза, поскольку апоптоз служит естественным путём элиминации любых стареющих и повреждённых клеток, в том числе и лимфоцитов [17].

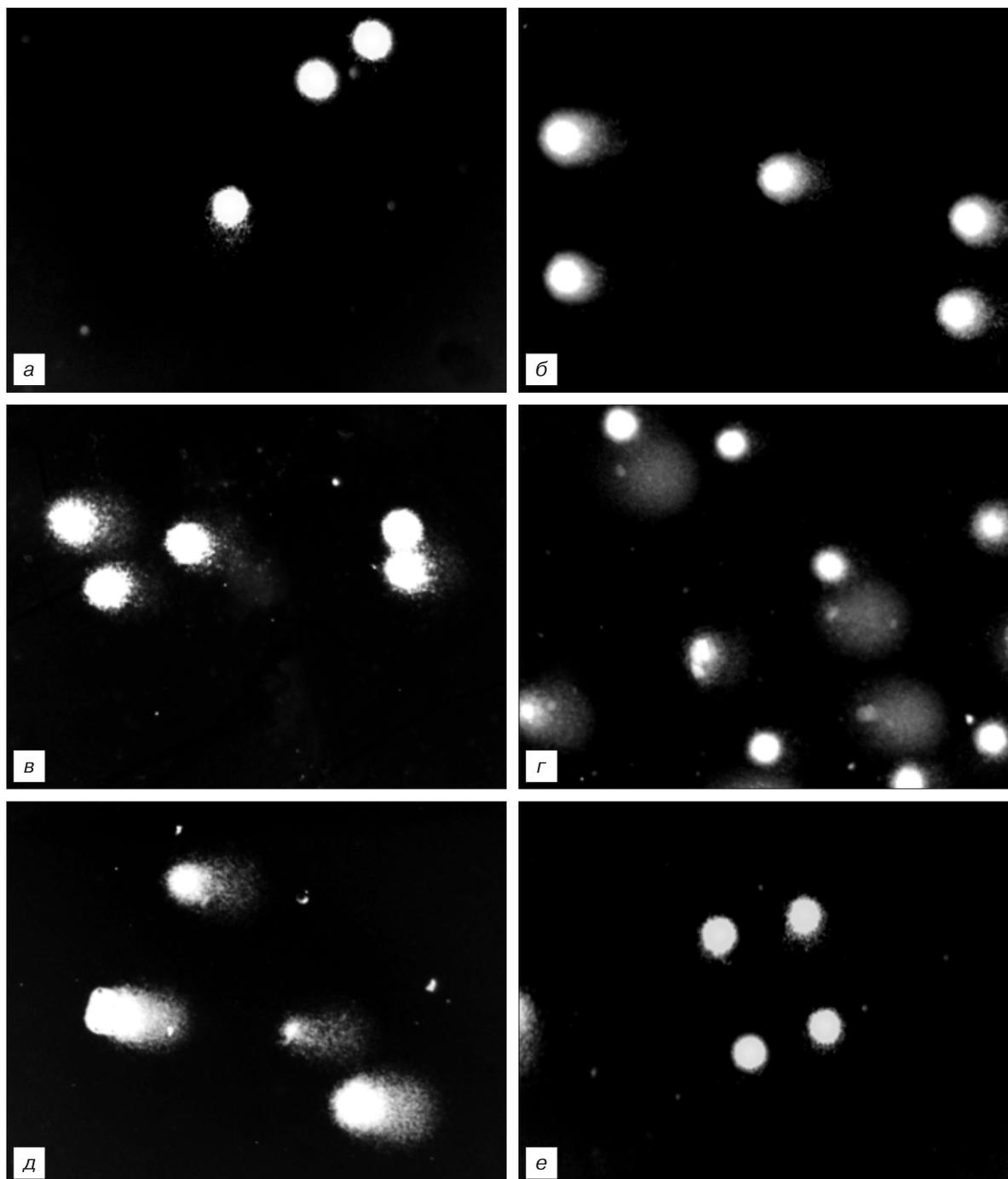


Рис. 2. Микрофотографии ДНК-комет лимфоцитов периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С и здоровых добровольцев.

a – 1-я группа; *б* – 2-я группа, *в* – 3-я группа, *г* – 4-я группа, *д* – 5-я группа, *е* – 6-я группа. Окраска бромидом этидия. $\times 200$.

Заключение

Проведённое исследование показало взаимосвязь между стадией выраженности фиброза и степенью деструкции ДНК-лимфоцитов периферической крови. Максимально процесс деструкции ДНК-лимфоцитов периферической крови установлен у пациентов с ХВГС с исходом в цирроз. Это позволило рассматривать метод ДНК-

комет как перспективный дополнительный вспомогательный метод в оценке формирования фиброза печени. Кроме того, метод перспективен и в получении информации о состоянии генетического аппарата клеток пациента в целом на примере лимфоцитов, что может быть использовано для прогноза вероятности формирования гепатокарциномы.

ЛИТЕРАТУРА

- Ostling O., Johanson K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; 123 (1): 291–8.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1988; 175 (1): 184–91.
- Olive P.L., Banáth J.P., Durand R.E. Detection of etoposide resistance by measuring DNA damage in individual Chinese hamster cells. *J. Natl Cancer Inst.* 1990; 82 (9): 779–83.
- Кропотов А.В., Челомин В.П., Солодова В.В., Слободскова В.В., Михайлов А.О. Оценка генотоксичности тетрахлорметана и защитного действия силибинина и хаурантина с помощью метода ДНК-комет. *Тихоокеанский медицинский журнал.* 2013. 2: 63–6.
- Liang L.D., He T., Du T.W., Fan Y.G., Chen D.S., Wang Y. Ginsenoside Rg5 induces apoptosis and DNA damage in human cervical cancer cells. *Mol. Med. Rep.* 2015; 11 (2): 940–6.
- Buchynska L., Brieieva O., Glushchenko N., Vorobyova L., Bilyk O. DNA repair deficiency in peripheral blood lymphocytes of endometrial cancer patients with a family history of cancer. *BMC Cancer.* 2014; 14: 765.
- Guttikonda V.R., Patil R., Kumar G. DNA damage in peripheral blood leukocytes in tobacco users. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* 2014; 18 (Suppl. 1): S16–20.
- Xavier D.J., Takahashi P., Manoel-Caetano F.S., Foss-Freitas M.C., Foss M.C., Donadi E.A. et al. One-week intervention period led to improvements in glycemic control and reduction in DNA damage levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabet. Res. Clin. Pract.* 2014; 105 (3): 356–63.
- Мороз В. В., Решетняк В. И., Муравьева М. Ю., Жанатаев А. К., Марченков Ю. В., Дурнев А. Д. Обмен холестерина, ДНК-повреждения, апоптоз и некроз клеток в крови при тяжелой сочетанной травме. *Общая реаниматология.* 2008; 1: 7–11.
- Shawki S.M., Meshaal S.S., El Dash A.S., Zayed N.A., Hanna M.O. Increased DNA damage in hepatitis c virus-related hepatocellular carcinoma. *DNA Cell Biol.* 2014; 33 (12): 884–90.
- Grossi S., Sumberaz A., Gosmar M., Mattioli F., Testino G., Martelli A. DNA damage in peripheral blood lymphocytes of patients with cirrhosis related to alcohol abuse or to hepatitis B and C viruses. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2008; 20 (1): 22–5.
- Sakae P.N., Ihara S.S., Ribeiro D.A., de Carvalho L., Parise E.R. Insulin resistance is associated with DNA damage in peripheral blood cells in non-diabetic patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Free Radic. Res.* 2013; 47 (9): 750–6.
- Решетняк В.И., Шарафанова Т.И., Ильченко Л.Ю., Порошенко Г.Г. Исследование структуры ДНК лимфоцитов периферической крови у больных хроническими вирусными поражениями печени. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2002. 4: 459–62.
- Reshetnyak V.I., Sharafanova T.I., Ilchenko L.U., Golovanova E.V., Poroshenko G.G. Peripheral blood lymphocytes DNA in patients with chronic liver diseases. *World J. Gastroenterol.* 2001; 7 (2): 235–7.
- Oliveira A.C., Parise E.R., Catarino R.M., Lanzoni V., Leite-Mor M.M., Simon K.A. et al. Insulin resistance and not steatosis is associated with modifications in oxidative stress markers in chronic hepatitis C, non-3 genotype. *Free Radic. Res.* 2009; 43 (12): 1187–94.
- Farinati F., Cardin R., Degan P., De Maria N., Floyd R.A., Van Thiel D.H. et al. Oxidative DNA damage in circulating leukocytes occurs as an early event in chronic HCV infection. *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 27 (11–12): 1284–91.
- Буверов А.О. Апоптоз гепатоцитов и лейкоцитов периферической крови при хронических гепатитах В и С: Дис. ... мед. наук. М.; 2009.
- Olive P.L., Banáth J.P., Durand R.E. Detection of etoposide resistance by measuring DNA damage in individual Chinese hamster cells. *J Natl Cancer Inst.* 1990; 82 (9): 779–83.
- Kropotov A.V., Chelomin V.P., Solodova V.V., Slobodskova V.V., Mihajlov A.O. Estimation of genotoxicity carbon tetrachloride and protective-effect of silibinin and haurantin by comet assay. *Tikhookeanskiy medicinskiy zhurnal.* 2013. 2: 63–6. (in Russian)
- Liang L.D., He T., Du T.W., Fan Y.G., Chen D.S., Wang Y. Ginsenoside Rg5 induces apoptosis and DNA damage in human cervical cancer cells. *Mol. Med. Rep.* 2015; 11 (2): 940–6.
- Buchynska L., Brieieva O., Glushchenko N., Vorobyova L., Bilyk O. DNA repair deficiency in peripheral blood lymphocytes of endometrial cancer patients with a family history of cancer. *BMC Cancer.* 2014; 14: 765.
- Guttikonda V.R., Patil R., Kumar G. DNA damage in peripheral blood leukocytes in tobacco users. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* 2014; 18 (Suppl. 1): S16–20.
- Xavier D.J., Takahashi P., Manoel-Caetano F.S., Foss-Freitas M.C., Foss M.C., Donadi E.A. et al. One-week intervention period led to improvements in glycemic control and reduction in DNA damage levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabet. Res. Clin. Pract.* 2014; 105 (3): 356–63.
- Мороз В. В., Решетняк В. И., Муравьева М. Ю., Жанатаев А. К., Марченков Ю. В., Дурнев А. Д. Обмен холестерина, ДНК-повреждения, апоптоз и некроз клеток в крови при тяжелой сочетанной травме. *Общая реаниматология.* 2008; 1: 7–11.
- Shawki S.M., Meshaal S.S., El Dash A.S., Zayed N.A., Hanna M.O. Increased DNA damage in hepatitis c virus-related hepatocellular carcinoma. *DNA Cell Biol.* 2014; 33 (12): 884–90.
- Grossi S., Sumberaz A., Gosmar M., Mattioli F., Testino G., Martelli A. DNA damage in peripheral blood lymphocytes of patients with cirrhosis related to alcohol abuse or to hepatitis B and C viruses. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2008; 20 (1): 22–5.
- Sakae P.N., Ihara S.S., Ribeiro D.A., de Carvalho L., Parise E.R. Insulin resistance is associated with DNA damage in peripheral blood cells in non-diabetic patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Free Radic. Res.* 2013; 47 (9): 750–6.
- Решетняк В.И., Шарафанова Т.И., Ильченко Л.Ю., Порошенко Г.Г. Исследование структуры ДНК лимфоцитов периферической крови у больных хроническими вирусными поражениями печени. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2002. 4: 459–62.
- Reshetnyak V.I., Sharafanova T.I., Ilchenko L.U., Golovanova E.V., Poroshenko G.G. Peripheral blood lymphocytes DNA in patients with chronic liver diseases. *World J. Gastroenterol.* 2001; 7 (2): 235–7.
- Oliveira A.C., Parise E.R., Catarino R.M., Lanzoni V., Leite-Mor M.M., Simon K.A. et al. Insulin resistance and not steatosis is associated with modifications in oxidative stress markers in chronic hepatitis C, non-3 genotype. *Free Radic. Res.* 2009; 43 (12): 1187–94.
- Farinati F., Cardin R., Degan P., De Maria N., Floyd R.A., Van Thiel D.H. et al. Oxidative DNA damage in circulating leukocytes occurs as an early event in chronic HCV infection. *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 27 (11–12): 1284–91.
- Bueverov A.O. *Апоптоз гепатоцитов и лейкоцитов периферической крови при хронических гепатитах В и С: Дис. ... мед. наук.* М.; 2009.

Поступила 22.12.14

REFERENCE

- Ostling O., Johanson K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984; 123 (1): 291–8.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1988; 175 (1): 184–91.

Сведения об авторах

Александр Олегович Михайлов – клинический интерн кафедры терапии, функциональной и ультразвуковой диагностики ФПКППС, e-mail: maol1991@mail.ru. 690002, г. Владивосток, проспект Острякова, 2;

Надежда Семеновна Иванова – кандидат химических наук, доц., заведующая кафедрой общей и биологической химии, 690002, г. Владивосток, просп. Острякова, 2;

Анна Ивановна Симакова – доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой инфекционных болезней, e-mail: anna-inf@yandex.ru, 690002, г. Владивосток, проспект Острякова, 2.

Received 22.12.14