

Т.В. Сегеда,
Н.А. Мітряєва,
Т.С. Бакай,
Л.В. Гребіник,
Н.А. Бабенко

ДУ Інститут медичної
радіології ім. С.П. Григор'єва
НАМН України, Харків

Вплив поєднаної дії іонізуючого випромінювання та етопозиду на сфінгом'єліновий цикл у сироватці крові щурів-пухлиноносіїв

Influence of simultaneous action of ionizing
radiation and etoposide on sphingomyelin cycle
in the blood serum of tumor carrying rats

Цель работы: Изучение влияния сочетанного действия ионизирующего излучения и этопозиды на сфингомиелиновый цикл (активность кислой Zn^{2+} -зависимой сфингомиелиназы, церамида и сфингомиелина) в сыворотке крови крыс с перевитой карциномой Герена.

Материалы и методы: В качестве экспериментальной модели использовали крыс популяции Вистар с массой тела 160–180 г с подкожно перевитой карциномой Герена. Зону роста опухоли облучали на аппаратах РУМ-17 (рентгеновское излучение) и Clinac 600 C (высокоэнергетическое фотонное излучение) фракционированно с интервалом между сеансами 24 часа, поглощенная доза на фракцию 5 Гр, суммарная доза на зону роста опухоли составляла 10 Гр.

Противоопухолевый препарат этопозид («Тева») вводили внутривенно за 24 ч до первого сеанса облучения в дозе 8 мг/кг массы тела. Декапитацию проводили через 24 часа после последнего сеанса облучения. Для определения активности фермента сфингомиелина в сыворотке крови в качестве субстрата использовали [холин-метил- ^{14}C] сфингомиелин (1924 МБк/ммоль, PerkinElmer, USA). Экстракцию липидов из сыворотки крови проводили по методу Фолча. Для идентификации липидов использовали стандарты церамид и сфингомиелин (Sigma).

Радиоактивность образцов измеряли на счётчике БЕТА-1 («Медприбор», Киев). Статистический анализ проводили при использовании непараметрических методов для малых выборок и критерия Вилкоксона–Манна–Уитни.

Результаты: Показано, что этопозид достоверно повышает активность сфингомиелинового цикла в сыворотке крови по сравнению с контролем. При отдельном действии облучения не наблюдается изменений активности сфингомиелинового цикла. Установлено, что при сочетанном действии рентгеновского или высокоэнергетического фотонного излучения и этопозиды активность кислой Zn^{2+} -зависимой сфингомиелиназы возрастает на 81 и 91 % соответственно, при этом уровень проапоптозного церамида повышается в 4,4 и в 4,7 раза, а уровень антиапоптозного сфингомиелина снижается в 2,6 и 2,5 раза соответственно по сравнению с контролем.

Выводы: Сочетанное действие радиации и этопозиды обуславливает усиление активности кислой Zn^{2+} -зависимой сфингомиелиназы, что приводит к накоплению проапоптозного липида церамида в составе липопротеидов сыворотки крови крыс-опухоленосителей, что, в свою очередь, может индуцировать гибель клеток микроваскулярного эндотелия и, таким образом, способствует регрессии опухоли.

Ключевые слова: опухоль Герена, церамид, сфингомиелин, кислая Zn^{2+} -зависимая сфингомиелиназа, этопозид, ионизирующее излучение, апоптоз.

Мета роботи: Вивчення впливу поєднаної дії іонізуючого випромінювання й етопозиду на сфінгом'єліновий цикл (активність кислої Zn^{2+} -залежної сфінгом'єлінази, цераміду та сфінгом'єліну) у сироватці крові щурів з перещепленою карциномою Герена.

Матеріали та методи: Експерименти було проведено на щурах популяції Вистар масою тіла 160–180 г з підшкірно перещепленою карциномою Герена. Зону росту пухлини опромінювали на апаратах РУМ 17 (рентгенівське випромінювання)

Objective: To investigate the influence of ionizing radiation and etoposide on sphingomyelin cycle (activity of acid Zn^{2+} -dependent sphingomyelinase, ceramide and sphingomyelin) in the blood serum of the rats with inoculated Guerin's carcinoma.

Material and Methods: Wistar rats weighing 160-180 g with subcutaneously inoculated Guerin's carcinoma were used as an experimental model. The zone of the tumor growth was irradiated using РУМ-17 unit (x-rays) and Clinac 600 C unit (high-energy photons) in fractions with 24-hour intervals, absorbed dose per fraction 5 Gy, total dose on the tumor growth zone 10 Gy.

An antitumor drug etoposide (Teva) was administered intraperitoneally 24 hours before the first course of irradiation at a dose of 8 mg/kg body mass. Decapitation was performed 24 hours after the last irradiation. To determine sphingomyelin enzyme activity in the blood serum of rats, [cholin-methyl- ^{14}C] sphingomyelin (1924 MBq/mmol, PerkinElmer, USA) was used as a substrate. Lipid extraction from the serum was done using Folch technique. To identify lipids standard ceramide and sphingomyelin (Sigma) were used.

Radioactivity of the samples was measured using БЕТА-1 counter (Medpribor, Kyiv). Statistical analysis was done using non-parametric methods for small samples and criterion Wilcoxon-Mann-Whitney criterion.

Results: It was shown that etoposide significantly increased activity of sphingomyelin cycle in the blood serum when compared with the controls. At separate action of irradiation, the changes in the activity of sphingomyelin cycle were not observed. It was established that simultaneous action of x-rays or high-energy photons and etoposide, activity of acid Zn^{2+} -dependent sphingomyelinase increased by 81 and 91 % , respectively, with this the level of proapoptosis ceramide increased 4.4 and в 4.7 times and the level of apoptotic sphingomyelin decreased 2.6 and 2.5 times, respectively, when compared with the controls.

Conclusion: Simultaneous action of radiation and etoposide results in increased activity of acid Zn^{2+} -dependent sphingomyelinase, which results in accumulation of proapoptosis lipid ceramide in the lipoproteids of the blood serum in tumor-carrying rats, which, in turn, can induce cell death in the microvascular epithelium and thus promotes tumor regression.

Key words: Guerin's carcinoma, ceramide, sphingomyelin, acid Zn^{2+} -dependent sphingomyelinase, etoposide, ionizing radiation, apoptosis.

і Clinac 600 С (високоенергетичне фотонне випромінення) фракціоновано з інтервалом між сеансами 24 години, поглинута доза на фракцію 5 Гр, сумарна поглинута доза на зону росту новоутвору — 10 Гр.

Противухлинний препарат етопозид («Тева») вводили внутріочеревинно за 24 год до першого сеансу опромінення у дозі 8 мг/кг маси тіла тварин. Декапітацію проводили за 24 години після останнього сеансу опромінення. Для визначення активності ферменту як субстрат використовували [холін-метил-¹⁴C] сфінгомелін (1924 МБк/ммоль (PerkinElmer, USA). Ліпіди з сироватки крові екстрагували методом Фолча. З метою ідентифікації ліпідів використовували стандарти кераміду та сфінгомеліну (Sigma). Радіоактивність зразків вимірювали на лічильнику БЕТА-1 («Медприлад», Київ). Статистичний аналіз даних проводили при використанні непараметричних методів для малих вибірок і критерію Вілкоксона–Манна–Уїтні.

Результати: Показано, що етопозид вірогідно підвищує активність сфінгомелінового циклу в сироватці крові порівняно з контролем. При дії окремо самого опромінення активність сфінгомелінового циклу не змінюється. Встановлено, що при поєднаній дії рентгенівського або високоенергетичного фотонного випромінення й етопозиду активність кислоти Zn²⁺-залежної сфінгомелінази зростає на 81 та 96 % відповідно, при цьому рівень проапоптозного кераміду підвищується в 4,4 і в 4,7 рази, а рівень антиапоптозного сфінгомеліну знижується в 2,6 та 2,5 рази відповідно порівняно з контролем.

Висновки: Поєднана дія радіації та етопозиду зумовлює посилення активності кислоти Zn²⁺-залежної сфінгомелінази, внаслідок чого проапоптозний ліпід керамід накопичується в складі ліпопротеїдів сироватки крові щурів-пухлинноносіїв, що може індукувати загибель клітин мікрovasкулярного ендотелію і, таким чином, сприяє регресії пухлин.

Ключові слова: пухлина Герена, керамід, сфінгомелін, кислота Zn²⁺-залежна сфінгомеліназа, етопозид, іонізувальне випромінення, апоптоз.

Однією з основних причин радіорезистентності пухлини вважають порушення регуляції апоптозу. Велику увагу дослідників привертає апоптоз за участю проапоптозного ліпиду кераміду (ЦМ). Саме з порушенням узлоякісних клітинних різних ланок обміну ЦМ, який діє як вторинний месенджер в ініціації апоптичної відповіді через мітохондріальні системи, пов'язують радіорезистентність пухлини [1, 2]. При вивченні керамід-індукованого апоптозу під впливом дії іонізувальної радіації (ІВ) пильну увагу приділяють продуктам сфінгомелінового циклу. Останній включає генерацію ЦМ у результаті ферментативного гідролізу сфінгомеліну (СФМ) за участю сфінгомелінази та являє універсальну, еволюційно-консервативну систему [3–5]. Індукція сфінгомелінового циклу, яка приводить до накопичення проапоптичного агента — ЦМ, може розглядатися як новий механізм активації радіаційно-індукованого апоптозу пухлинних клітин, що має значення для подолання радіорезистентності. Отже пошук шляхів направленої активації керамідного апоптозу при дії ІВ залишається актуальним. Одним із перспективних напрямків індукції керамідного апоптозу вважають використання радіосенсибілізаторів, зокрема хемопрепарату «Етопозид» [6, 7].

Дослідженнями останніх років доведено, що радіація, впливаючи безпосередньо на плазматичні мембрани клітин, активує при цьому кислоту Zn²⁺-залежну сфінгомеліназу. З'ясовано провідну роль останньої у радіаційно-індукованому апоптозі, зокрема у процесах залучення екстрацелюлярного гідролізу сфінгомеліну. Однак недостатньо вивчена активність кислоти Zn²⁺-залежної

сфінгомелінази в сироватці крові щурів-пухлинноносіїв при поєднаній дії різних видів ІВ і хемопрепаратів.

Метою роботи було вивчення впливу поєднаної дії ІВ та етопозиду на сфінгомеліновий цикл (активність кислоти Zn²⁺-залежної сфінгомелінази, вміст ЦМ та СФМ) у сироватці крові щурів з перещепленою карциномою Герена.

Методика дослідження

Експерименти проведено на 54 щурах з масою тіла 160–180 г. Всі дослідження виконували з дотриманням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, використовуваних для експериментів та інших наукових цілей (Страсбург, 1985), і національних Загальних етичних принципів експериментів на тваринах (Україна, 2001). Щурам підшкірно вводили 0,5 мл 20 % суспензії клітин, отриманих з пухлинної тканини експериментальної карциноми Герена (Guerin's carcinoma), штамп якої було одержано з Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Експеримент починали на 10–12-ту д після перещеплення пухлини, коли діаметр новоутвору досягав 1,5–2,0 см. Коливання середнього об'єму пухлини на момент початку експерименту не перевищувало 10 %. Знеживлення тварин здійснювали під ефірним наркозом через 24 год після опромінення або після введення хемопрепарату. Піддослідних тварин розподіляли на групи методом випадкового добору по 9 особин у кожній: група 1 — контроль, 2 — етопозид, 3 — опромінення (ікс-випромінення), 4 — опромінення (високоенергетичне фотонне випромінення), 5 — ікс-випромінення + етопозид, група 6 — високоенергетичне фотонне випромінення + етопозид.

У першій серії експерименту пухлини опромінювали на апараті РУМ-17 (ікс-випромінення) за стандартних технічних умов: напруга — 190 кВ, сила струму — 10 мА, фільтри: 0,5 мм Сu плюс 1 мм Al, потужність дози (потужність повітряної керми), виміряної в повітрі — 0,981 Гр/хв, фокусна відстань — 30 см. Опромінення проводили двома фракціями по 5 Гр, з інтервалом між сеансами 24 год, час опромінення — 4 хв 39 с, сумарна поглинута доза на зону росту пухлини складала 10 Гр.

У другій серії експерименту пухлину опромінювали на лінійному прискорювачі Clinac 600 С (високоенергетичне фотонне випромінення (ВЕФ-випромінення), двома фракціями по 5 Гр, з інтервалом між сеансами 24 год,

поглинута доза на зону росту пухлини складала 10 Гр. Енергія фотонів 6 МеВ, потужність дози 4 Гр/хв, розмір поля 5 × 5, глибина 1 см. Розрахункова кількість моніторингових одиниць для опромінення пухлини Герена в дозі 5 Гр дорівнювала 515.

Хемопрепарат етопозид «Тева» вводили внутріочеревинно за 24 год до першого сеансу опромінення у дозі 8 мг/кг маси тіла тварини.

Для визначення активності ферменту СФМ як субстрат використовували [холін-метил-¹⁴С] СФМ з питомою радіоактивністю 1924 МБк/ммоль (PerkinElmer, USA). До складу інкубаційної суміші входили: 0,1 мМ ацетатний буфер (рН 5,0) з додаванням 1 мМ ЕДТА, 1 % тритон Х-100, 0,1 мМ ZnCl₂, 2 мМ [холін-метил-¹⁴С] СФМ, ендогенний СФМ мозку бика і 0,1 мл сироватки крові. Суміш інкубували при температурі 37 °С протягом 3 годин. Реакцію зупиняли додаванням охолодженої суміші: хлороформ-метанол (1: 2, v/v); [холін-метил-¹⁴С] СФМ і [холін-метил-¹⁴С] фосфорилхолін екстрагували за допомогою багаторазової послідовної екстракції суспензії хлороформом, метанолом і водою. Активність кислоти Zn²⁺-залежної сфінгомелінази в сироватці крові щурів-пухлиноносців оцінювали за інтенсивністю переходу мітки у вигляді [холін-метил-¹⁴С] фосфорилхолін у хлороформу фази, яку використовували для хроматографічного розподілу ліпідів і визначення радіоактивності [¹⁴С] фосфорилхоліну. Питому радіоактивність розраховували в імпульсах на хвилину на 1 мг білка. Радіоактивність зразків вимірювали за допомогою лічильників БЕТА-1 («Медприлад», Київ). Вміст білка в сироватці крові визначали методом Лоурі [8]. Зважаючи на те, що до складу середовища інкубації входили іони Zn²⁺, а кислотність дорівнювала рН 5,0, можна вважати дані умови експерименту адекватними меті дослідження, яка полягала у визначенні активності кислоти Zn²⁺-залежної секретованої сфінгомелінази.

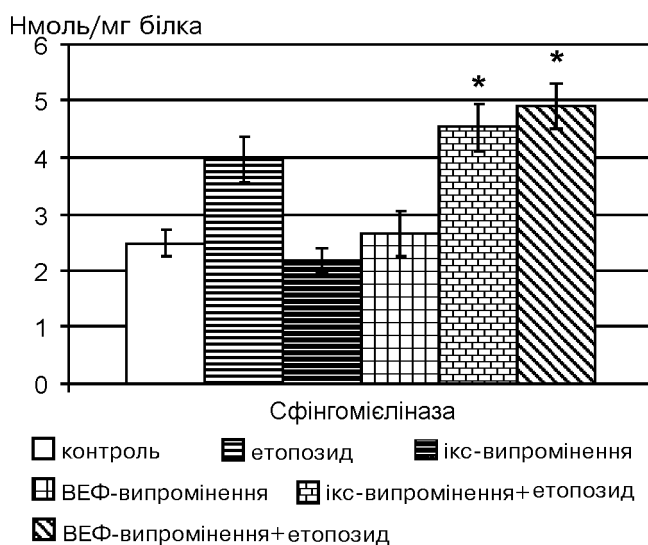
Екстракцію ліпідів із сироватки крові проводили методом Фолча [9]. Розділяли ЦМ і СФМ за допомогою хроматографії в тонкому шарі силікагелю на комерційних пластинках Sorbfil (АО «Сорбполимер», Росія). Екстракти ліпідів, які використовували для аналізу сфінголіпідів, випаровували у вакуумі та інкубували 60 хв при температурі 37 °С в середовищі хлороформ-метанол (1:1, v/v), в яке додавали NaOH (0,1 моль) для гідролізу ацилгліцеринів. Ліпіди знову екстрагували і використовували для розподілу на класи (СФМ, ЦМ) у системі розчинників: хлороформ-етилацетат-ізопропіловий спирт-метанол — 0,25 % KCl (25:25:25:10:9) [10]. Ліпіди (СФМ, ЦМ) проявляли в парах йоду та ідентифікували за допомогою порівняння із стандартами цераміду і сфінгомеліну (Sigma), виражаючи в нмоль/мг білка.

Статистичний аналіз даних проводили за допомогою статистичних програм для ПК Statistica, version 5 при використанні непараметричних методів для малих вибірок та критерію Вілкоксона-Манна-Уїтні.

Результати та їх обговорення

Визначення активності кислоти Zn²⁺-залежної сфінгомелінази при дії етопозиду в сироватці крові щурів з перещепленою карциномою Герена свідчило про її зростання на 59% порівняно з контролем (рисунок 1). При локальному опроміненні пухлин вірогідних змін активності ферменту порівняно з контролем не визначено, як і вірогідної різниці в зміні активності Zn²⁺-залежної сфінгомелінази у двох групах тварин, підданих впливу дії різних видів випромінювання. При поєднаній дії

ікс-випромінювання та етопозиду активність збільшувалася на 81 %, а при дії ВЕФ-випромінювання та етопозиду — на 96% порівняно з контролем (див. рисунок 1).



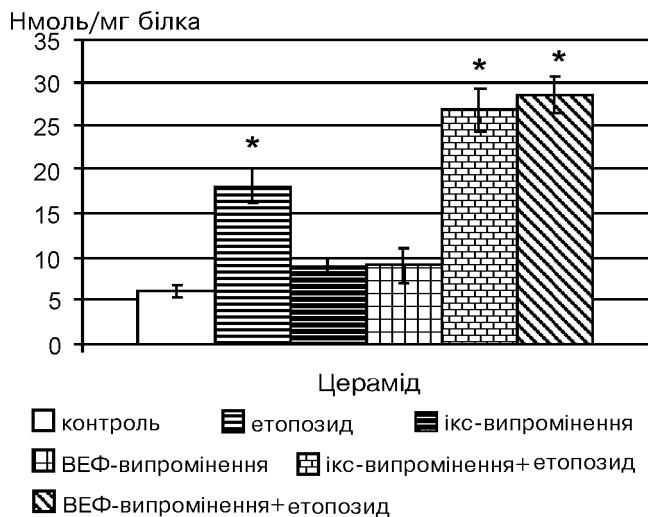
Примітка. У кожній групі n — 9; * — вірогідно відносно контрольної групи, p < 0,05 (критерій Вілкоксона-Манна-Уїтні).

Рисунок 1. Активність Zn²⁺-залежної кислоти сфінгомелінази в сироватці крові щурів-пухлиноносців за рівнем ¹⁴С-фосфорилхоліну, продукованого в результаті ферментативного гідролізу ¹⁴С-сфінгомеліну, при дії іонізуючого випромінювання, етопозиду та їх поєднання, нмоль/мг білка за 3 год інкубації

Figure 1. Activity of Zn²⁺-dependent acid sphingomyelinase in the blood serum of tumor carrying rats by ¹⁴C-phosphorilcholin level produced as a result of fermentation hydrolysis of ¹⁴C-sphingomyelin at exposure to ionizing radiation, etoposide and their combination, nmol/mg of protein within 3 hours of incubation

Таким чином, проведеними дослідженнями доведено, що у щурів з пухлиною Герена відбувається секреція в сироватку крові Zn²⁺-залежної кислоти сфінгомелінази. Зважаючи на те, що за участі останньої утворюється не тільки фосфорилхолін, а й проапоптичний сфінголіпід — ЦМ, збільшення його вмісту у складі ліпопротеїдів сироватки крові може індукувати загибель клітин мікроциркуляторного ендотелію, і, таким чином, сприяти регресії пухлини [11]. У зв'язку з цим вміст ЦМ у сироватці крові може залежати від інтенсивності процесів деградації СФМ і транспорту ліпопротеїдів.

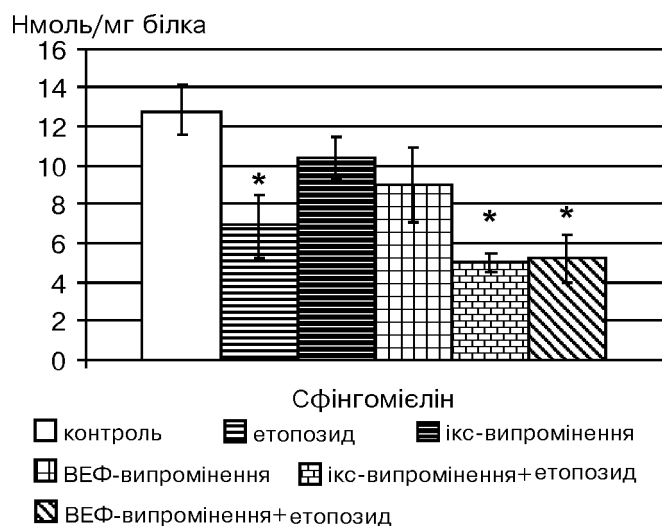
З огляду на це наступна серія досліджень була присвячена вивченню вмісту ЦМ і СФМ у сироватці крові щурів-пухлиноносців за поєднаної дії ІВ та етопозиду. При цьому встановлено, що при дії етопозиду в 3 рази підвищувався вміст ЦМ у сироватці крові щурів-пухлиноносців порівняно з контролем (рисунок 2). Вміст СФМ знижувався в 1,9 разу (рисунок 3).



Примітка. * Вірогідно по відношенню до контрольної групи, $p < 0,05$ (критерій Вілкоксона–Манна–Уїтні).

Рисунок 2. — Вплив іонізуючого випромінювання, етопозиду та їх поєднаної дії на вміст цераміду в сироватці крові щурів-пухлиноносців (нмоль/мг білка)

Figure 2. Influence of ionizing radiation, etoposide and their combination on ceramide amount in the blood serum of tumor-carrying rats (nmol/mg of protein)



Примітка. * Вірогідно відносно до контрольної групи, $p < 0,05$ (критерій Вілкоксона–Манна–Уїтні).

Рисунок 3. Вплив іонізуючого випромінювання, етопозиду та їх поєднаної дії на вміст сфінгом'єліну в сироватці крові щурів-пухлиноносців (нмоль/мг білка)

Figure 3. Influence of ionizing radiation, etoposide and their combination on sphingomyelin amount in the blood serum of tumor-carrying rats (nmol/mg of protein)

При вивченні впливу радіації на вміст сфінголіпідів у сироватці крові щурів з перещепленою пухлиною Герена не виявлено вірогідних змін вмісту ЦМ та СФМ. При поєднаній дії ікс-випромінювання й етопозиду показане підвищення рівня ЦМ у 4,4 разу та зниження вмісту СФМ у 2,6 на фоні підвищення активності сфінгом'єлінази. При поєднаній дії ВЕФ-випромінювання та етопозиду рівень ЦМ зростав у 4,7, а рівень СФМ знижував-

ся в 2,5 разу, тобто доведено активацію сфінгом'єлінового циклу при використанні поєднаної дії різних джерел ІВ та етопозиду. Ці дані підтверджують, що до індукованого етопозидом накопичення ЦМ залучений механізм, пов'язаний з активністю сфінгом'єлінази. Можливо, під впливом препарату активізується синтез цих сфінголіпідів у тканинах та їх транспорт у кров, або гальмується деградація і подальше перетворення ЦМ в інші сфінголіпіди.

Таким чином, досліджено вплив поєднаної дії різних джерел ІВ та етопозиду на вміст ЦМ, СФМ і активність Zn^{2+} -залежної кислотої сфінгом'єлінази в сироватці крові щурів-пухлиноносців. В дослідженнях F. Paris та співавт. показано, що значна кількість Zn^{2+} -залежної кислотої сфінгом'єлінази секретується клітинами васкулярного ендотелію, що дає можливість припущення щодо ендотеліального походження цього ферменту в сироватці крові та його можливої ролі в екстраклітинному гідролізі СФМ [12]. Етопозид виявився потужним індуктором накопичення відомого проапоптозного ліпиду ЦМ у сироватці крові. Застосування етопозиду перед опроміненням супроводжувалося посиленням секреції з клітин досліджуваного ферменту і зростанням його активності в сироватці крові щурів-пухлиноносців, незалежно від типу випромінювання. Слід також зазначити, що поєднана дія опромінення та етопозиду викликала накопичення ЦМ у сироватці, що може бути свідченням підвищення продукції цього ліпиду в інших тканинах.

Активація сфінгом'єлінового циклу під впливом радіомодифікації веде до накопичення проапоптичного агента ЦМ у крові, що, в свою чергу, може індукувати апоптоз клітин мікроваскулярного ендотелію пухлини і сприяти її регресії, та бути одним з механізмів індукції радіаційно-індукованого апоптозу пухлини. Перспективним є пошук препаратів, що посилюють активність сфінгом'єлінази з метою активації накопичення ЦМ, який індукує апоптоз у клітинах пухлини за умов хемопроменевої терапії.

Висновки

1. Етопозид є потужним індуктором активації сфінгом'єлінового циклу в сироватці крові щурів-пухлиноносців.

2. Локальне опромінення новоутвору не активує сфінгомієлінового циклу в сироватці крові щурів з перещепленою карциномою Герена.

3. При поєднаній дії ікс- або високоенергетичного фотонного випромінення та етопозиду в сироватці крові щурів-пухлиноносіїв порівняно з контрольною групою підвищується активність Zn^{2+} -залежної кислої сфінгомієлінази та рівень проапоптозного ЦМ і знижується рівень антиапоптозного СФМ. Накопичення ЦМ у крові, в свою чергу, може індукувати загибель клітин мікроваскулярного ендотелію і, таким чином, сприяти регресії пухлин.

4. Процес активації сфінгомієлінового циклу під впливом радіомодифікації не залежить від виду іонізуючого випромінення, що вказує на його універсальність.

Література

1. Modrak D. E., Gold D. V., Goldenberg D. M. // *Mol. Cancer Ther.* – 2006. – Vol. 5. – P. 200–208.
2. Reynolds C.P., Maurer B.J., Kolesnik R.N. // *Cancer Lett.* – 2004. – Vol. 206. – P. 169–180.
3. Smith E. L., Schuchman E. H. // *The FASEB journal.* – 2008. – Vol. 22. – P. 3419–3431.
4. Andrieu-Abadie N., Levade T. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2002. – Vol. 1585. – P. 126–134.
5. Kok J.W., Sietsma H. // *Curr. Drug. Targets.* – 2004. – Vol. 5. – P. 375–382.
6. Sawada M., Nakashima S., Banno G. et al. // *Cell. Death Differ.* – 2000. – Vol. 7. – P. 761–772.
7. Perry D., Carton J., Shah A. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 9078–9084.
8. Lowry O., Rosebrough N., Farr A. // *Ibid.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
9. Folch J., Lees M., Stanley G. // *Ibid.* – 1957. – Vol. 226. – P. 497–509.
10. Dolgachev V., Farooqui M., Kulaeva O., Tainisky M. et al. // *Ibid.* – 2004. – Vol. 279. – P. 23238–23249.
11. Sathishkumar S., Boyanovsky B., Karakashian A.A. et al. // *Cancer Biol. Ther.* – 2005. – Vol. 4, №9. – P. 979–986.
12. Paris F., Fuks Z., Kang A. et al. // *Science.* – 2001. – Vol. 293. – P. 293–297.

Надходження до редакції 19.11.2012.

Прийнято 09.01.2013.

Адреса для листування:
Мітряєва Наталія Андріївна,
ДУ Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва
НАМН України,
вул. Пушкінська, 82, Харків, 61024, Україна