

## ДИНАМИКА ИММУННОГО СТАТУСА БОЛЬНЫХ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИММУНОКОРРЕКЦИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕДИКАМЕНТОЗНЫХ И НЕМЕДИКАМЕНТОЗНЫХ МЕТОДОВ

Меньшенина А.П., Златник Е.Ю., Загора Г.И., Селютина О.Н., Моисеенко Т.И.,  
Ушакова Н.Д., Франциянц Е.М.

*ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия, e-mail: anna.menshenina.00@mail.ru*

Больным местно-распространенным раком шейки матки проводили неoadъювантное лечение, включающее полихимиотерапию, плазмаферез и иммуномодулятор аллокин-альфа, также изучали динамику иммунного статуса методами проточной цитометрии и ИФА. Результаты: при применении плазмафереза, в том числе с аллокином-альфа, наблюдалось снижение уровня Т-reg клеток; при проведении только полихимиотерапии происходило повышение уровня CD38+Т-лимфоцитов. Содержание цитокинов свидетельствует о минимальном воспалительном и неопластическом компоненте у больных после применения в курсе неoadъювантной полихимиотерапии и плазмафереза с аллокином-альфа, о чем говорит снижение уровней IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-10 по сравнению с больными других групп. Мы считаем целесообразным включение эфферентных методов и иммуномодуляции аллокином-альфа в комплексное лечение больных раком шейки матки.

Ключевые слова: рак шейки матки, химиотерапия, плазмаферез, аллокин-альфа, Т-regs, цитокины.

## DYNAMICS OF IMMUNE STATUS OF PATIENTS WITH CERVICAL CANCER DURING IMMUNOCORRECTION USING DRUG AND NON-DRUG METHODS

Menshenina A.P., Zlatnik E.Y., Zakora G.I., Selyutina O.N., Moiseenko T.I.,  
Ushakova N.D., Frantsiyants E.M.

*Federal Budget State Institution «Rostov Cancer Research Institute» of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russia, e-mail: anna.menshenina.00@mail.ru*

Patients with locally advanced cervical cancer were given neoadjuvant treatment, including polychemotherapy, plasmapheresis and immunomodulator «Allokin-alpha»; we also have studied the dynamics of the immune status by flow cytometry and ELISA. Results: the level of T-reg cells decreased during plasmapheresis with «Allokin-alpha», during polychemotherapy the level of CD38+ T-cells increased. Content of the cytokines shows minimal inflammatory and neoplastic component in patients after a combination of neoadjuvant chemotherapy and plasmapheresis with «Allokin-alpha» as evidenced by lower levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-10 compared with those of other groups. We consider it expedient to include efferent methods and immunomodulation by Allokin-alpha in complex treatment of patients with cervical cancer.

Keywords: cervical cancer, chemotherapy, plasmapheresis, «Allokin-alpha», T-regs, cytokines.

В настоящее время рак шейки матки в большинстве стран мира продолжает оставаться наиболее частой злокачественной опухолью женских половых органов. Одним из направлений в химиотерапии первично выявленного местно-распространенного рака шейки матки (МРРШМ) является применение ее в качестве неoadъювантной. Методы терапии сопровождения также нашли применение в комплексном лечении онкологических больных. Среди них особое место занимают эфферентные методы и применение иммуномодуляторов.

По мнению немецких исследователей, лекарственный плазмаферез (ПА) способен повысить эффективность лечения за счет снижения резистентности к химиопрепаратам, неизбежно развивающейся в процессе лечения, особенно в условиях раковой интоксикации [8]. В исследованиях, проведенных в Ростовском научно-исследовательском онкологическом

институте, доказано, что проведение ПА перед неoadъювантной полихимиотерапией (ПХТ) у больных распространенным раком яичников способствует нормализации или существенному улучшению состояния общей реактивности организма, обеспечивая компенсацию эндогенной интоксикации и позволяя сохранять дозовую интенсивность ПХТ у больных с высоким риском развития осложнений [4, 6]. Исследована и проанализирована переходная динамика реагирования организма на детоксикационные, цитостатические и иммуномодулирующие воздействия при проведении неoadъювантной химиотерапии больным МРРШМ IB-IIIВ стадий. Выявлено, что включение в программу лечения плазмафереза и иммуномодуляции обеспечивает синергизм и пролонгирование активности механизмов антистрессорной защиты, а также повышение противоопухолевой сопротивляемости организма больной [7].

Препараты интерферонов давно известны и применяются в онкологии как самостоятельно, так и в качестве терапии сопровождения. В настоящее время привлекает все больший интерес возможность эффективного использования индукторов интерферонов, особенно при заболеваниях с доказанной вирусной этиологией. Авторы исходят из того, что своевременная санация очагов папилломавирусной инфекции может приводить к снижению заболеваемости онкологической патологией, в частности, при поражении шейки матки и слизистой гортани [2]. Представляет несомненный интерес оценка эффективности подобных препаратов при их включении в комплексное лечение рака шейки матки. Подходы, объединяющие химиотерапию, детоксикацию и иммуномодуляцию могут оказаться плодотворными для лечения данной патологии.

Целью данной работы является оценка иммунного статуса у больных раком шейки матки в динамике неoadъювантной ПХТ, включающей использование плазмафереза (ПА) и иммуномодулятора аллокина-альфа (АА).

### **Материалы и методы**

Под наблюдением находились 72 больных РШМ T<sub>1b2-2b</sub>N<sub>0-1</sub>M<sub>0</sub> стадий в возрасте от 25 до 48 лет, проходивших лечение в отделении онкогинекологии Ростовского научно-исследовательского института онкологии в период с 2009 по 2015 год. Первым этапом лечения у всех пациенток применялась неoadъювантная ПХТ по схеме: цисплатин (75 мг/м<sup>2</sup> в 1 день введения) и блеомицетин (20 мг/м<sup>2</sup> в 1 и в 5 дни химиотерапии). Пациентки были разделены на 2 группы в зависимости от модификации инициального лечения: I (контрольную) группу составили 19 больных, получавших стандартную внутривенную ПХТ; II (основную) группу составили 48 больных, разделенных на 2 подгруппы: 22 больным проведен сеанс гравитационного ПА, через сутки после которого начинали курс неoadъювантной ПХТ; 26 больным проведен сеанс гравитационного ПА, через сутки после

которого начинали курс цитостатической терапии. На следующий день после окончания первого курса химиотерапии начинали курс иммуномодуляции препаратом «Аллокин-альфа» (6 инъекций препарата подкожно через день в суммарной дозе 6 мг).

Оценку иммунного статуса проводили в следующей динамике: до начала лечения, после ПА+ПХТ, через 3 недели после начала лечения; у больных, получавших АА, дополнительно через 6 недель после начала лечения. Кровь брали из локтевой вены в пробирку с антикоагулянтом (ЭДТА), в ней определяли популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов на проточномцитометре FACSCantoII (BD) с панелью моноклональных антител Т-, В-, NK (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD16/56); дополнительно изучали количественное содержание активированных Т-лимфоцитов обеих основных субпопуляций, экспрессирующих маркеры ранней (CD38) и поздней (HLA-DR) активации, а также Т-регуляторных (T-regs) клеток (CD4+CD25+CD127dim). Результаты выражали в процентах от общего количества лимфоцитов, для T-regs в процентах от CD3+CD4+ клеток, для активированных – в процентах от CD3+CD4+ и CD3+CD8+ клеток. Рассчитывали также абсолютные значения показателей клеточного иммунитета.

Содержание цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 в сыворотках определяли методом ИФА с тест-системами производства «Вектор-Бест» (Новосибирск), результаты выражали в пг/мл.

Статистическую обработку данных выполняли с помощью параметрических и непараметрических методов (t-критерий Стьюдента, критерий Уилкоксона, метод непрямых разностей).

### Результаты и их обсуждение

Результаты представлены в табл. 1–2 и на рис. 1–4.

Таблица 1

#### Динамика некоторых показателей иммунного статуса у больных РШМ, получавших стандартную ПХТ(n=19)

Сроки исследования	Показатели (%)												
	Лимфоциты	CD3+	CD3+CD4+	CD3+CD8+	CD19+	CD16/56+	CD3+CD38+	CD4+CD38+	CD8+CD38+	CD3+HLA DR+	CD4+HLA DR+	CD8+HLA DR+	T-reg
До начала лечения	25,7 ±1,72	76,2 ±1,67	47,2 ±1,91	24,9 ±2,1	11 ±0,82	11,96 ±1,28	20,9 ±2,09	24,8 ±2,32	11,16 ±1,55	11,08 ±1,72	8,14 ±1,2	15,74 ±2,23	7,1 ±0,56
После 1-й ПХТ	12,27 ±1,24*	68,76 ±1,65*	39,2 ±1,81	25,3 ±2,22	14,33 ±1,01	16,04 ±1,6	17,11 ±2,11	20,04 ±2,27	10,00 ±1,72	11,64 ±1,73	8,81 ±1,08	16 ±2,33	7,44 ±0,36
3 нед. после начала лечения	26,56 ±0,25**	77,2 ±1,96**	47,1 ±2,27	25,96 ±2,27	8,76 ±0,61*	12,86 ±1,6	30,45 ±3,23**	31,36 ±2,51**	24,5 ±4,35**	15,1 ±3,91	12,1 ±4,02	20,78 ±3,95	8,89 ±0,96

Примечание. \* – статистически достоверные отличия от исходного показателя; \*\* – статистически достоверные отличия от срока после 1-й ПХТ (p<0,05).

Таблица 2

**Динамика некоторых показателей иммунного статуса у больных РШМ, получавших**

**ПА + ПХТ + аллокин- $\alpha$ (n=26)**

Сроки исследования	Показатели (%)												
	Лимфоциты	CD3+	CD3+CD4+	CD3+CD8+	CD19+	CD16/56+	CD3+CD38+	CD4+CD38+	CD8+CD38+	CD3+HLA-DR+	CD4+HLA-DR+	CD8+HLA-DR+	T-reg
До начала лечения	27,0 ±1,86	76,6 ±1,39	45,7 ±1,93	26,21 ±1,86	10,68 ±0,81	11,66 ±1,12	24,17 ±2,77	27,37 ±2,77	17,2 ±3,78	14,28 ±2,03	8,53 ±1,48	17,8 ±2,87	6,54 ±0,99
После ПА+ПХТ	16,01 ±2,0*	72,35 ±0,2*	40,54 ±1,97	26,6 ±2,19	12,84 ±1,4	13,95 ±1,76	20,98 ±2,48	23,84 ±2,45	13,95 ±2,38	10,76 ±1,47	7,17 ±0,89	14,2 ±2,02	6,4 ±0,71
3 нед. после начала лечения	27,06 ±1,64**	78,65 ±1,49**	47,24 ±2,18	25,8 ±1,84	9,41 ±0,86	10,9 ±1,29	24,8 ±2,93	28,24 ±2,91	17,25 ±2,78	12,1 ±1,4	7,37 ±0,84	17,37 ±2,16	7,5 ±0,85
6 нед. после начала лечения	27,45 ±3,13	78,5 ±2,24	47,9 ±2,67	25,73 ±2,65	7,35 ±0,67*	13,1 ±2,01	30,1 ±4,68	32,9 ±4,78	21,19 ±3,61	11,42 ±1,52	8,78 ±1,69	17,9 ±2,36	6,34 ±0,47

Примечание. \* – статистически достоверные отличия от исходного показателя; \*\* – статистически достоверные отличия от срока ПА+ПХТ (p<0,05).

При анализе динамики показателей клеточного иммунитета у больных сравниваемых групп выявлен ряд общих тенденций и ряд различий, представленных в табл. 1 и 2.

Общими для них иммунологическими изменениями являются транзиторное снижение количества лимфоцитов и зрелых Т-лимфоцитов (CD3+) после 1-го курса ПХТ с последующим восстановлением до исходного уровня, а также статистически достоверное снижение процентного и абсолютного содержания В-лимфоцитов.

У больных контрольной группы через 3 недели после проведения курса ПХТ отмечено статистически значимое повышение процента Т-клеток с маркером ранней активации CD38+, относящихся к обеим субпопуляциям (CD3+CD4+ и CD3+CD8+) (табл. 1, рис. 1); при этом экспрессия маркера поздней активации (HLA-DR) не меняется. При вычислении исследуемых показателей в абсолютных значениях у больных данной группы также определяется транзиторное снижение ряда показателей (лимфоцитов, CD3+, CD3+CD4+, CD38+, HLA-DR+ Т-клеток, Т-reg) с последующим восстановлением до исходного уровня; одновременно отмечается снижение абсолютного уровня В-лимфоцитов (с  $0,25 \pm 0,04$  до  $(0,14 \pm 0,01) \times 10^9/\text{л}$ ) (p<0,05).

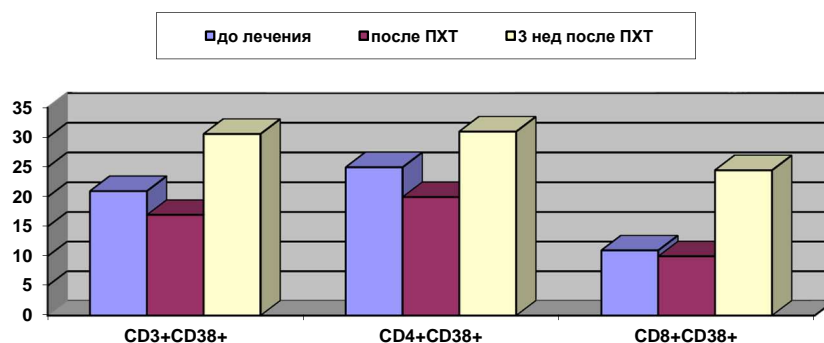
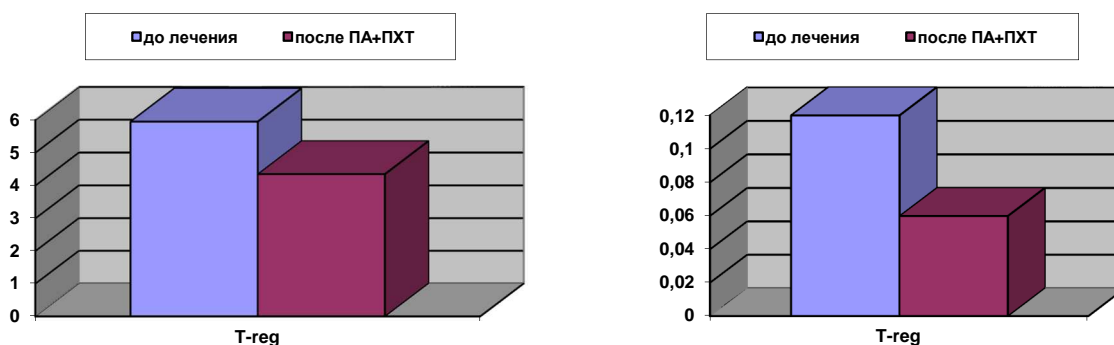


Рис. 1. Уровень активированных Т-лимфоцитов у больных РШМ в динамике проведения ПХТ (%)

У больных, получавших ПА+ПХТ, по завершении неoadъювантного этапа лечения не наблюдалось статистически значимых изменений исследованных параметров иммунного статуса, вычисленных в процентах, кроме снижения уровня Т-regs  $5,95 \pm 0,65$  до  $4,35 \pm 0,15\%$  ( $p < 0,05$ ), (рис. 2А). Абсолютные значения демонстрировали снижение содержания уровня лимфоцитов (с  $2,15 \pm 0,23$  до  $(1,53 \pm 0,13) \times 10^9/\text{л}$ ), CD3+ (с  $1,5 \pm 0,1$  до  $(1,1 \pm 0,11) \times 10^9/\text{л}$ ), CD3+CD8+ (с  $0,46 \pm 0,05$  до  $(0,33 \pm 0,04) \times 10^9/\text{л}$ ), а снижение количества Т-рег оказалось двукратным: с  $0,12 \pm 0,001$  до  $(0,065 \pm 0,02) \times 10^9/\text{л}$  (рис. 2Б). Для данных параметров различия статистически достоверны ( $p < 0,05$ ).



А

Б

Рис. 2. Уровень Т-рег у больных РШМ до и после проведения ПА+ПХТ: А - %; Б -  $\times 10^9/\text{л}$

Как видно из табл. 2, у больных, получавших ПА+ПХТ+АА, при вычислении в относительных значениях не выявлено статистически достоверных отличий от исходных показателей, кроме временного снижения уровней лимфоцитов и Т-клеток. В финале неoadъювантного лечения у них регистрировалось снижение абсолютных показателей содержания CD19+ (с  $0,2 \pm 0,01$  до  $(0,12 \pm 0,03) \times 10^9/\text{л}$ ), CD3+CD8+ ( $0,48 \pm 0,03$  до  $(0,31 \pm 0,05) \times 10^9/\text{л}$ ), и CD3+HLA-DR+ (с  $0,30 \pm 0,0$  до  $(0,14 \pm 0,02) \times 10^9/\text{л}$ ) клеток (во всех случаях  $p < 0,05$ ).

При сравнении исследованных параметров больных различных групп после завершения неoadьювантного курса ПХТ наблюдался статистически достоверно более низкий уровень T-reg у больных обеих подгрупп основной группы по сравнению с контрольной (6,34±0,47 и 4,35±0,15 против 8,89±0,96 % в контрольной группе; p<0,05). Кроме того, выявлены статистически достоверно более низкие уровни CD3+ клеток у больных, получавших ПА без АА, по сравнению как с контролем, так и с подгруппой, получавшей его, которые составили 72,1±2,22 % после проведения ПА+ПХТ, 78,5±2,24 % после дополнительного применения АА и 77,2±1,96 % в контрольной группе. Остальные изученные показатели, вычисленные в процентах, не имели различий.

При сопоставлении абсолютных уровней исследованных параметров по окончании лечения общее количество T-лимфоцитов, экспрессирующих маркер поздней активации (CD3+HLA-DR+), оказалось выше после применения ПА+ПХТ, чем при дополнительном использовании АА (0,24±0,02 против (0,14±0,02)×10<sup>9</sup>/л), однако, уровень активированных цитотоксических T-клеток CD8+HLA-DR+, напротив, был выше в подгруппе больных, получавших АА (0,27±0,05 и (0,15±0,01)×10<sup>9</sup>/л соответственно, p<0,05). Последнее позволяет предположить активацию цитотоксического звена иммунной системы, важного для реализации противоопухолевого ответа, под действием аллокина-альфа. Возможно, такие изменения являются компенсаторными, поскольку развиваются на фоне снижения общего количества CD3+CD8+ клеток.

В обеих подгруппах основной группы отмечены более низкие абсолютные уровни T-reg (0,12±0,01 в контроле, 0,06±0,02 после применения ПА+ПХТ; 0,09±0,01 после применения ПА+ПХТ+АА; p<0,05) (рис. 3).

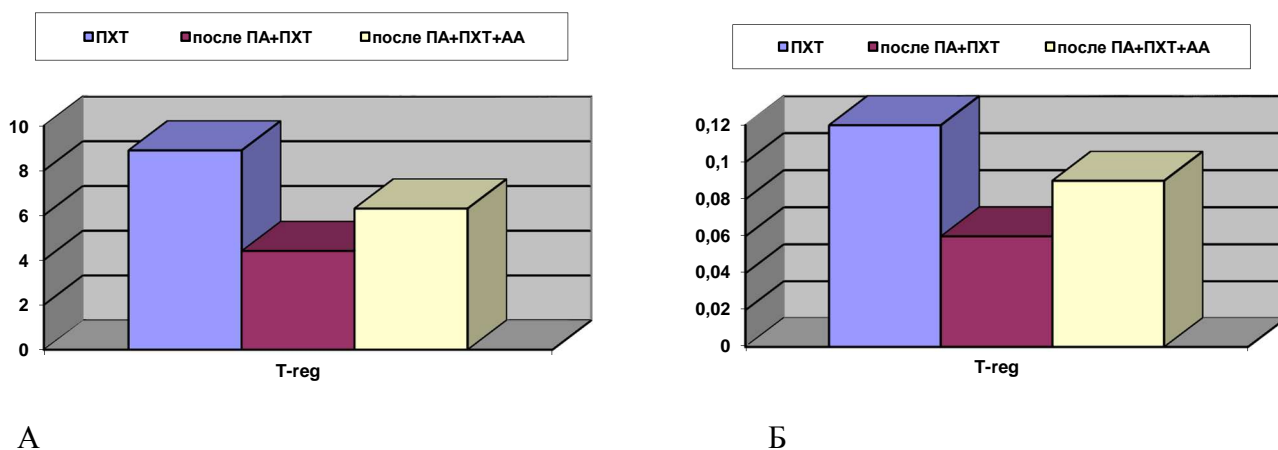
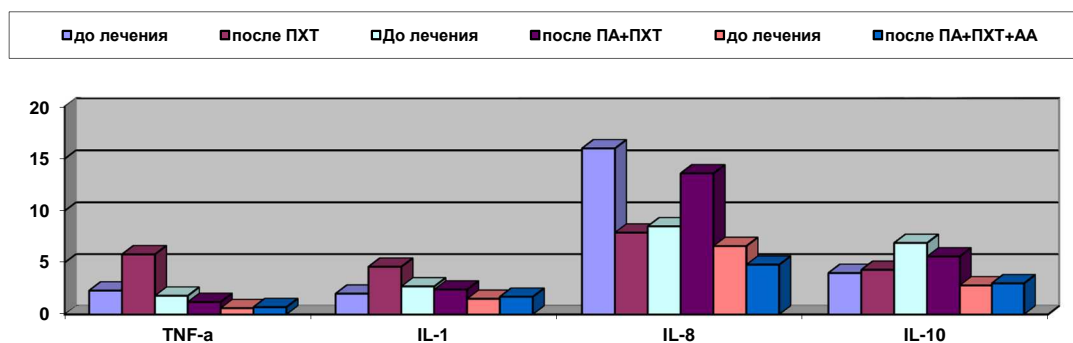


Рис. 3. Процентное и абсолютное содержание T-reg клеток у больных РШМ после различных видов лечения. А - %; Б - ×10<sup>9</sup>/л

Результаты изучения сывороточных уровней цитокинов у больных сравниваемых групп представлены на рис. 4, из которого виден ряд различий между ними.



*Рис. 4. Динамика уровней некоторых цитокинов у больных РШМ при различных методах лечения (пг/мл)*

Так, уровень IL-8 нарастал в подгруппе, получавшей ПА+ПХТ, с  $8,5 \pm 1,7$  до  $13,6 \pm 3,2$  пг/мл и, напротив, снижался при дополнительном применении АА и в контрольной группе. При этом если в контрольной группе его снижение происходило с  $16,1 \pm 5,5$  до  $7,9 \pm 1,5$  пг/мл, то снижение после лечения с использованием ПА и АА наблюдалось с исходно более низких цифр (с  $6,6 \pm 1,9$  до  $4,8 \pm 1,7$  пг/мл) и в финале оказывалось статистически достоверно ниже, чем после применения ПА, а также в контроле ( $p < 0,05$ ). В контрольной группе отмечено нарастание уровней провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ , которые по завершении неаодъювантного этапа лечения оказывались выше, чем у больных обеих подгрупп основной группы. Содержание IL-10, обладающего иммуносупрессивными свойствами и нарастающего при неблагоприятном течении злокачественных опухолей, было минимальным у больных, получавших ПА+ПХТ+АА ( $2,9 \pm 0,26$  пг/мл против  $5,6 \pm 1,3$  в подгруппе с ПА+ПХТ и  $4,3 \pm 0,4$  в контрольной группе;  $p < 0,05$ ).

Итак, изучение влияния проведения химиотерапии, модифицированной эфферентными методами и иммуномодулятором аллокином-альфа, на иммунный статус больных РШМ показало во многом сходную динамику, которая, однако, представляется более благоприятной у больных обеих основных групп по сравнению с контролем. Как при применении ПА, так и при дополнительном использовании препарата аллокина-альфа, обнаружено существенное снижение Т-регклеток, считающихся иммуносупрессивными и проонкогенными [9]. Снижение содержания этих клеток и их продуктов в динамике лечения описано как прогностически благоприятный фактор при злокачественных опухолях [10] и хронической ВПЧ-инфекции [1]. Кроме того, обращает на себя внимание повышение уровня активированных Т-лимфоцитов с мембранным рецептором CD38 у больных контрольной группы после лечения, в отличие от обеих основных групп, хотя при финальном исследовании статистически значимых различий между ними и не найдено. В литературе есть данные о высоком уровне растворимого рецептора CD38 при некоторых

онкологических заболеваниях, который рассматривается как механизм, ограничивающий межклеточные взаимодействия и способствующий ускользанию опухоли от иммунного надзора [5]. Развитие неопластического процесса сопровождается повышением его уровня, а эффективное лечение – снижением. Поскольку количество растворимого рецептора CD38 коррелирует с содержанием CD38+ клеток, являющихся его источником, повышение последнего также расценивается как неблагоприятный прогностический фактор. Обнаруженное нами повышение процентного и абсолютного содержания лимфоцитов, экспрессирующих этот маркер, у больных контрольной группы может отражать менее благоприятный прогноз после проведения стандартной ПХТ по сравнению с ПХТ в сопровождении ПА и иммуномодуляцией аллокином-альфа. Однако для решения данного вопроса необходимы дальнейшие исследования.

Динамика сывороточного содержания цитокинов у больных различных групп свидетельствует о минимальном воспалительном и неопластическом компоненте у больных, получавших ПА+ПХТ+АА по сравнению с больными других групп.

### **Заключение**

Таким образом, мы расцениваем полученные при применении в курсе химиотерапии ПА и аллокина-альфа иммунологические данные как прогностически благоприятные и отражающие клиническую динамику больных раком шейки матки [3]. Представляется целесообразным включение эфферентных методов и иммуномодуляции индуктором интерферона в комплексное лечение больных раком шейки матки.

*Исследование выполнено при поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-4427.2014.7 «Новые технологии молекулярной детоксикации и клеточной иммунотерапии в комплексе персонализированного лечения и реабилитации больных при злокачественных опухолях гениталий».*

### **Список литературы**

1. Ковчур П.И., Олейник Е.К., Бахлаев И.Е., Чуров А.В., Олейник В.М. Клиническая эффективность «аллокина-альфа» и его влияние на экспрессию маркеров регуляторных лимфоцитов Treg при лечении больных с хронической ВПЧ-инфекцией //Материалы 10 Всероссийского научного форума форум Мать и дитя 30 июня – 2 июля 2009. – С. 127.
2. Короленкова Л.И. Снижение вирусной нагрузки, определенной методом гибридного захвата, у больных тяжелыми интраэпителиальными неоплазиями шейки матки, как результат эффективной предэкзцизионной терапии аллокином-альфа // Акушерство и гинекология. – 2012. – № 4/2. – С. 78-82.



3. Меньшенина А.П., Моисеенко Т.И., Франциянц Е.М., Ушакова Н.Д., Назаралиева Н.А. Сравнительная оценка различных модификаций предоперационной полихимиотерапии у больных местнораспространенным раком шейки матки // Журнал «Фундаментальные исследования». – № 1 (часть 8). – 2015 – С. 1629-1633.
4. Неродо Г.А., Ушакова Н.Д., Горошинская И.А., Мкртчян Э.Т., Меньшенина А.П. Применение плазмафереза в комплексном лечении распространенного рака яичников III-IV стадий // Известия ВУЗОВ Северо-Кавказский регион. Естественные науки. – 2014. – № 1–С. 98-102.
5. Новиков В.В., Алясова А.В., Уткин О.В., Лютина Е.В., Новиков Д.В., Варшавская Л.В. Растворимые антигены CD38 и CD95 при раке молочной железы // Росс. Биотерапевтический журнал. – 2005. – № 3. – Т.4. – С. 46-51.
6. Ушакова Н.Д., Неродо Г.А., Горошинская И.А., Златник Е.Ю., Мкртчян Э.Т., Меньшенина А.П. Оценка эффективности плазмафереза в лечении больных раком яичников // Российский медицинский журнал. – 2014. – № 3. – С.21-26.
7. Шихлярова А.И., Меньшенина А.П., Моисеенко Т.И., Ушакова Н.Д. Отражательная динамика адаптационных реакций при проведении плазмафереза и иммунотерапии в ходе лекарственного лечения рака шейки матки // Журнал «Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки». – Ростов-на-Дону, 2015. – № 1. – С. 114-118.
8. Vambauer R., Latzo R., Schiel R. Therapeutic plasma exchange and selective plasma separation methods. Fundamental technologies, pathology and clinical results – 2013 – P. 395-402.
9. Beyer M., Schultze J.L. Regulatory T cells in cancer // Blood. – 2006. – V.108. – № 3. – P. 804-811.
10. Kono K., Kawada H., Takahashi A., Sugai H., Mimura K., Miyagawa N., Omata H., Fujii H. CD4+CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers // Cancer Immunol. and Immunother. – 2006. – V.55, № 9. – P.1064-1071.

**Рецензенты:**

Каймакчи О.Ю., д.м.н., ассистент кафедры онкологии Ростовского государственного медицинского университета, г. Ростов-на-Дону;

Николаева Н.В., д.м.н., ассистент кафедры онкологии Ростовского государственного медицинского университета, г. Ростов-на-Дону.