

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЯДРЫШКОВЫХ ОРГАНИЗАТОРОВ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ХОЛОДОВОМ СТРЕССЕ И В ПОСТГИПОТЕРМИЧЕСКОМ ПЕРИОДЕ

Бобров И.П.¹, Лычева Н.А.¹, Крючкова Н.Г.¹, Лепилов А.В.¹, Шахматов И.И.¹, Долгатов А.Ю.¹, Осипова А.В.¹, Красова А.А.¹

¹ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет Минздрава России», Барнаул, e-mail: ig.bobrov2010@yandex.ru

Целью работы являлась оценка морфофункциональной активности ядрышковых организаторов (AgNOR) гепатоцитов крысы при экспериментальном холодовом стрессе и в постгипотермический период. Исследование выполнено на 20 крысах линии Wistar. Гипотермию моделировали путем помещения животных, находящихся в индивидуальных клетках, в воду температурой 5 °С, при температуре окружающего воздуха 7 °С. Критерием прекращения воздействия служило достижение животными ректальной температуры 20-25 °С, что соответствовало глубокой степени гипотермии. В ходе эксперимента животные были разделены на 4 группы. Крысы 1-й группы умерщвлялись сразу после прекращения охлаждения, животные 2-й группы выводились из эксперимента через 2 суток после воздействия гипотермии, печень животных 3-й группы исследовали через 5 суток, и животных 4-й группы изучали через 14 дней после воздействия холодового фактора. Результаты исследования показали, что холодовый стресс оказывает выраженное воздействие на ядрышковый аппарат гепатоцитов крыс. Сразу после гипотермии в клетках печени экспериментальных животных отмечали уменьшение морфофункциональной активности AgNOR, что было связано с повреждающим действием холодового фактора на нуклеолярный аппарат. На 2-й день эксперимента (в начальный период адаптации) наблюдали широкую гетерогенность морфофункциональной активности AgNOR, что было связано с процессом образования новых ядрышек. На 5-й день количественные и морфометрические параметры AgNOR были наиболее высокими, что являлось следствием гипертрофии нуклеол. На 14-й день эксперимента активность AgNOR значительно уменьшалась. Таким образом, нуклеолярный аппарат клеток печени при холодовом стрессе подвергается повреждению, но в постгипотермическом периоде происходят явления гипертрофии и амплификации ядрышек, что приводит к активизации рибосомного синтеза и регенерации клеток печени.

Ключевые слова: гипотермия, печень, ядрышковые организаторы, рибосомный синтез.

MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF NUCLEOLAR ORGANIZER REGIONS OF HEPATIC CELLS AT THE EXPERIMENTAL COLD STRESS AND IN THE POST HYPOTHERMIC PERIOD

Bobrov I.P.¹, Lychjeva N.A.¹, Kryuchkova N.G.¹, Lepilov A.V.¹, Shahkmatov I.I.¹, Dolgatov A.Y.¹, Osipova A.V.¹, Krasova A.A.¹

¹FSBEI HE «Altai state medical university of the Ministry of Health of Russia», Barnaul, e-mail: ig.bobrov2010@yandex.ru

The objective of the work was the estimation of the morphofunctional activity of nucleolar organizer regions (AgNOR) of the rat hepatocytes at the experimental cold stress and in the post hypothermic period. The research was done with the help of 20 rats of Wistar line. The hypothermia was modeled by means of immersion of the animals, caged individually, into the water of 5° C at the environmental temperature of 7° C. The criteria of the termination of the influence was the reach by the animals their rectal temperature 20-25 °C, that showed the deep stage of hypothermia. During the experiment the animals were divided into 4 groups. The rats of the 1st group were killed immediately after the cold influence, the animals of the 2nd group were killed 2 days after the experiments, the hepar of the 3rd group animals was examined in 5 days and the 4th group animals were studied after 14 days of cold influence. The results of the research showed that the cold stress affects on the nucleus apparatus of rats' hepatocytes strongly. Immediately after the hypothermia the decrease of morphofunctional activity AgNOR in the hepatic cells of the experimental animals was noted what was connected with the influence of the cold factor on the nucleus apparatus. On the 2nd day of the experiment (in the initial period of adaptation) the wide heterogeneity of morphofunctional activity was watched what was connected with the process of new nuclear formation. On the 5th day the quantative and morphometric parameters AgNOR were the highest what was the consequence of hypotrophy of nucleus. On the 14th day of the experiment the activity of AgNOR sufficiently decreased. So, the nuclear apparatus of hepatic cells at the cold stress is damaged but in the

posthypothermic period the phenomenon of hypotrophy and amplification of nucleoli takes place that leads to the activity of ribosomal synthesis and hepatic cell regeneration.

Keywords: hypothermia, hepar, nucleolar organizer regions, ribosomal synthesis.

Ядрышко – это динамичная органелла клетки, и его структура отражает уровни трех основных процессов, связанных с биогенезом рибосом: синтез прерибосомальной рибонуклеиновой кислоты (преРНК), процессинг и миграцию рибонуклеопротеидных частиц в нуклеоплазму [1]. Одним из замечательных свойств ядрышек является их высокая пластичность, которая проявляется в изменении размеров, морфологии и локализации в ядре при реакции на многие внешние стрессовые воздействия, а также при адаптации к неблагоприятным факторам [2; 3]. По данным некоторых авторов, ядрышко можно рассматривать в качестве центральной фигуры, координирующей клеточный ответ на стрессовые воздействия [4]. Так, по данным Чучковой Н.Н. и соавт. (2016), экспериментальная алиментарная гиперхолестеринемия у крыс сопровождалась реактивной перестройкой нуклеолярного аппарата клеток печени (увеличивалось число мелких и плотных ядрышек), что свидетельствует о снижении синтетической активности гепатоцитов [5]. Солин А.В. и соавт. (2016) показали, что при адаптации к длительному стрессу, вызванному ограничением движения, в клетках печени крыс наблюдалось возрастание количества ядрышек [6]. Многие авторы также отмечали увеличение числа, площади ядрышек и ядрышко-ядерного соотношения при репаративной регенерации печени, в частности при экспериментальном циррозе и других патологиях [7; 8].

В литературе имеется небольшое количество работ, посвященных морфологии ядрышка клеток печени при гипотермии. Капрелянц А.С. и соавт. (1985) в гепатоцитах, подвергнутых гипотермии, отмечали перемещение ядрышка на периферию ядра, к его мембране, что данные авторы объясняют увеличением ядерно-цитоплазматических отношений и усилением регуляторного влияния ядра на цитоплазму [9]. По данным других авторов, под влиянием низкой температуры (2 часа при 0-4 °С) в печени крыс происходила дегрануляция ядрышек, а через 10 часов после помещения животных снова в нормальные температурные условия ультраструктура ядрышек восстанавливалась [10]. Молодых О.П. (2001) при электронной микроскопии в ядрышках клеток печени при холодовом стрессе отмечала явления сегрегации гранулярного и фибриллярного компонентов, которая отражает низкий уровень синтеза рибосомной РНК и, как следствие, низкий уровень метаболизма в целом [11]. Исследований ядрышковых организаторов клеток печени методом серебрения при воздействии холодом в литературе нами не обнаружено.

Целью исследования являлась оценка морфофункциональной активности ядрышковых организаторов гепатоцитов крысы при экспериментальном холодовом стрессе и

в постгипотермическом периоде.

Материал и методы исследования

Исследование выполнено на 20 белых крысах линии Wistar. Гипотермию моделировали путем помещения животных, находящихся в индивидуальных клетках, в воду температурой 5 °С, при температуре окружающего воздуха 7 °С. Критерием прекращения эксперимента служило достижение животными ректальной температуры 20-25 °С, что соответствовало глубокой степени гипотермии. Время экспозиции было индивидуальным и в среднем составляло 40 ± 5 мин. В ходе эксперимента животные были разделены на 4 группы. Животные 1-й группы ($n = 5$) умерщвлялись сразу после прекращения охлаждения, животные 2-й группы ($n = 5$) выводились из эксперимента через 2 суток после прекращения охлаждения, печень животных 3-й группы ($n = 5$) исследовали через 5 суток после прекращения охлаждения, и животных 4-й группы ($n = 5$) изучали через 14 дней после прекращения воздействия гипотермии.

Использование крыс в экспериментах осуществляли в соответствии с Европейской конвенцией по охране позвоночных животных, используемых в эксперименте, и директивами -86/609/ЕЕС [12]. Обезболивание и умерщвление животных проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Материал фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, забуференном по Лилли. Проводку материала осуществляли по изопропиловому спирту с помощью автомата проводки карусельного типа TISSUE-ТЕК VIPTM6 (Sakkura, Япония), заливали в парафин при помощи станции парафиновой заливки TISSUE-ТЕК TEC 5 (Sakkura, Япония). Гистологические срезы толщиной 4-7 мкм получали с использованием полуавтоматического роторного микротомы Ассu-Cut SRM (Sakkura, Япония). Окрашивали срезы гематоксилином и эозином в автомате для автоматической окраски микропрепаратов TISSUE-ТЕК Prisma (Sakkura, Япония) и заключали препараты под пленку в автомате для автоматического заключения микропрепаратов TISSUE-ТЕК Film (Sakkura, Япония). На окрашенных гематоксилином и эозином гистологических препаратах высчитывали число гепатоцитов в 5 полях зрения при увеличении $\times 400$ и индекс альтерации (процент некротизированных гепатоцитов).

Выявление ядрышковых организаторов осуществляли по двухступенчатому методу Daskal Y. et al., в нашей модификации [13; 14]. При увеличении $\times 1000$ под масляной иммерсией микроскопа высчитывали число ядрышек, суммарную площадь аргирофильных гранул (AgNORs) на 1 ядро, площадь одного ядрышкового организатора и ядрышко-ядерное соотношение (Ядр/яд) в относительных единицах (отн. ед.). Морфометрические измерения проводили с помощью аппаратно-программного комплекса, состоящего из программного

обеспечения для морфометрического анализа ВидеоТест-Морфология 5.2, цифровой камеры VIDI CAM (Россия), адаптированной к световому микроскопу Nikon Eclipse E200 (Япония), и персонального компьютера. У каждого животного исследовали не менее 25-30 ядер гепатоцитов.

Статистическую обработку материала проводили при помощи статистического пакета Statistica 6.0. Если при проверке статистических гипотез распределение данных было нормальным, то применяли методы параметрической статистики (t-test Стьюдента), а если полученные данные не соответствовали критериям нормального распределения (критерий Шапиро-Уилка $W = 0,89, p < 0,01$), то применяли методы непараметрической статистики: тест Колмогорова-Смирнова или U-тест Манна-Уитни. Данные считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

При окраске гистологических срезов печени экспериментальных животных ядрышковые организаторы четко выявлялись в виде черных гранул (AgNORs) на желтоватом фоне нуклеоплазмы ядра. Непосредственно после гипотермии среднее число AgNORs составило $1,2 \pm 0,1$ на 1 ядро. Средняя площадь AgNORs составила $2,7 \pm 0,2$ мкм² на 1 ядро. Средняя площадь 1 AgNORs составила $2,1 \pm 0,1$ мкм². Ядр/яд соотношение составило $0,11 \pm 0,01$ отн. ед. (таблица) (рис. 1а).

Морфофункциональная характеристика ядрышковых организаторов гепатоцитов в зависимости от срока проведения экспериментальной глубокой гипотермии (M±m)

Параметры гепатоцитов	Срок эксперимента			
	Сразу после гипотермии	Через 2 дня	Через 5 дней	Через 14 дней
Число AgNORs на 1 ядро	$1,2 \pm 0,1^*$	$2,35 \pm 0,1^*$	$3,4 \pm 0,1^*$	$2,0 \pm 0,1^*$
Площадь AgNORs на 1 ядро (мкм ²)	$2,7 \pm 0,2^*$	$5,6 \pm 0,2^*$	$8,7 \pm 0,2^*$	$4,2 \pm 0,2^*$
Площадь 1 AgNORs (мкм ²)	$2,1 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1^*$	$2,6 \pm 0,1^*$	$2,1 \pm 0,1^*$
Ядр/Яд соотношение (отн. ед)	$0,11 \pm 0,01^*$	$0,15 \pm 0,004^*$	$0,16 \pm 0,004$	$0,11 \pm 0,004^*$

Примечание: * - данные достоверны при $p < 0,05$.

Нами были построены гистограммы, характеризующие распределение клеточных элементов печени по площади AgNORs на 1 ядро. Анализ гистограммы, характеризующей распределение AgNORs сразу после гипотермии показал, что гепатоциты с площадью AgNORs от 1 до 1,99 мкм² составили 25,4%, от 2 до 2,99 мкм² – 38,6%, от 3 до 3,99 мкм² – 25,4%, от 4 до 4,99 мкм² – 2,6% и от 5 до 5,99 мкм² – 8%. Гистограмма имеет сдвиг влево и высокий пик в области клеток с площадью AgNORs от 2 до 2,99 мкм² на 1 ядро (рис. 2). Через 2 дня после проведения гипотермии среднее число AgNORs составило $2,35 \pm 0,1$ на 1

ядро. Средняя площадь AgNORs составила $5,6 \pm 0,2$ мкм² на 1 ядро. Средняя площадь 1 AgNORs составила $2,2 \pm 0,1$ мкм². Ядр/яд соотношение составило $0,15 \pm 0,004$ отн. ед. (таблица) (рис. 1б).

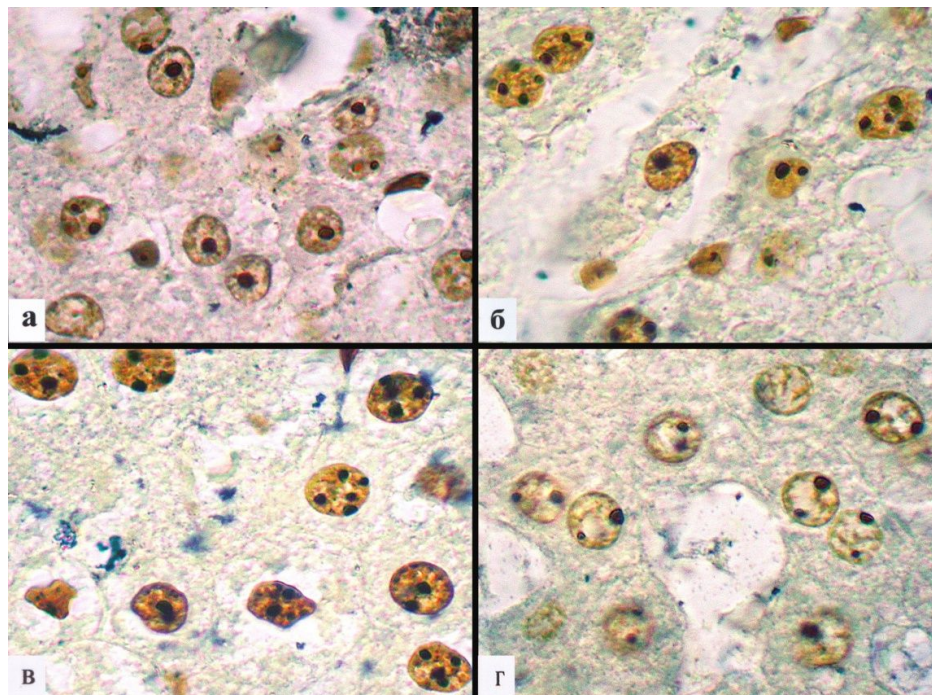


Рис. 1. Ядрышковые организаторы в ядрах гепатоцитов при холодном стрессе: а – единичные AgNORs сразу после прекращения воздействия гипотермии; б – начало увеличения числа AgNORs на 2-е сутки эксперимента; в – дальнейшее возрастание количества AgNORs на 5-е сутки эксперимента; г – уменьшение содержания AgNORs на 14-е сутки эксперимента. Окраска AgNOR по Боброву И.П. Увеличение $\times 1000$

Анализ гистограммы, характеризующей распределение клеточных элементов печени по площади AgNORs, через 2 дня после гипотермии показал, что гепатоциты с площадью AgNORs от 1 до 1,99 мкм² составили 0%, от 2 до 2,99 мкм² – 5,3%, от 3 до 3,99 мкм² – 16,5%, от 4 до 4,99 мкм² – 18,8%, от 5 до 5,99 мкм² – 22,6%, от 6 до 6,99 мкм² – 9,8%, от 7 до 7,99 мкм² – 16,5%, от 8 до 8,99 мкм² – 4,5%, от 9 до 9,99 мкм² – 5,3%, от 10 до 10,99 мкм² – 0%, от 11 до 11,99 мкм² – 0% и от 12 до 12,99 мкм² – 0,7%. При рассмотрении гистограммы отмечается широкая гетерогенность клеток по площади AgNORs на 1 ядро. В то же время уменьшается количество клеток печени, содержащих AgNORs с площадью от 1 до 3 мкм². Наиболее высокий пик отмечается в области клонов клеток, содержащих от 5 до 5,99 мкм² на 1 ядро. При этом на данном сроке эксперимента появляются новые клоны с площадью AgNORs от 6 до 6,99 мкм² – 9,8%, от 7 до 7,99 мкм² – 16,5%, от 8 до 8,99 мкм² – 4,5% и от 12 до 12,99 мкм² – 0,7% (рис. 3).

Через 5 дней после проведения гипотермии среднее число AgNORs составило $3,4 \pm 0,1$

на 1 ядро. Средняя площадь AgNORs составила $8,7 \pm 0,2$ мкм² на 1 ядро. Средняя площадь 1 AgNORs составила $2,6 \pm 0,1$ мкм². Ядр/яд соотношение составило $0,16 \pm 0,004$ отн. ед. (таблица) (рис. 1в).

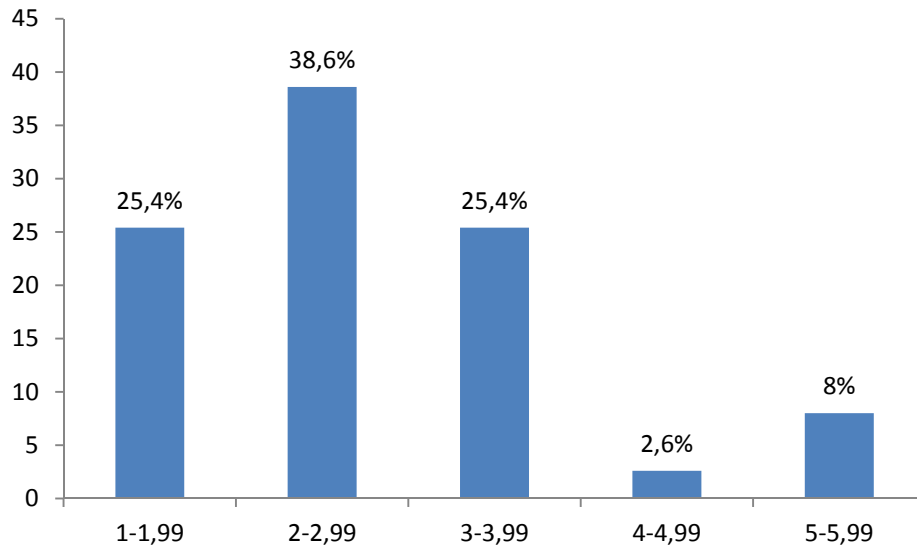


Рис. 2. Гистограмма, характеризующая распределение клеток печени по площади AgNORs на 1 ядро сразу после гипотермии. По оси абсцисс – площадь AgNORs (мкм²) на 1 ядро; по оси ординат процентное содержание клеток

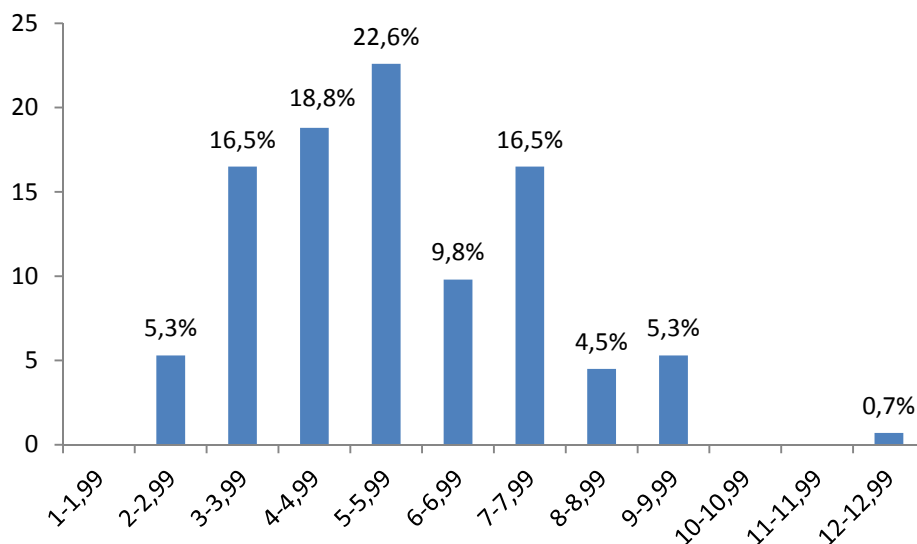


Рис. 3. Гистограмма, характеризующая распределение клеток печени по площади AgNORs на 1 ядро через 2 дня после гипотермии. По оси абсцисс – площадь AgNORs (мкм²) на 1 ядро; по оси ординат процентное содержание клеток

Анализ гистограммы, характеризующей распределение клеточных элементов печени по площади AgNORs, через 5 дней после гипотермии показал, что гепатоциты с площадью

AgNORs от 1 до 1,99 мкм² составили 0%, от 2 до 2,99 мкм² – 0%, от 3 до 3,99 мкм² – 0%, от 4 до 4,99 мкм² – 2,6%, от 5 до 5,99 мкм² – 6,4%, от 6 до 6,99 мкм² – 11,5%, от 7 до 7,99 мкм² – 11,5%, от 8 до 8,99 мкм² – 27,1%, от 9 до 9,99 мкм² – 19,2%, от 10 до 10,99 мкм² – 10,2%, от 11 до 11,99 мкм² – 5,1% и от 12 до 12,99 мкм² – 0%, от 13 до 13,99 мкм² – 2,6% и от 14 до 14,99 мкм² – 3,8%. При рассмотрении гистограммы видно, что отсутствуют клетки печени с площадью AgNORs от 1 до 3,99 мкм². Наиболее высокий пик отмечается в области клеток, содержащих от 8 до 8,99 мкм² на 1 ядро. При этом на данном сроке эксперимента возрастает число клеточных клонов с площадью AgNORs от 8 до 8,99 мкм² до 27,1%, от 9 до 9,99 мкм² до 19,2%, от 10 до 10,99 мкм² до 10,2% и от 11 до 11,99 мкм² до 5,17%. При этом появляются новые клоны с площадью AgNORs от 13 до 13,99 мкм² – 2,6% и от 14 до 14,99 мкм² – 3,8% (рис. 4).

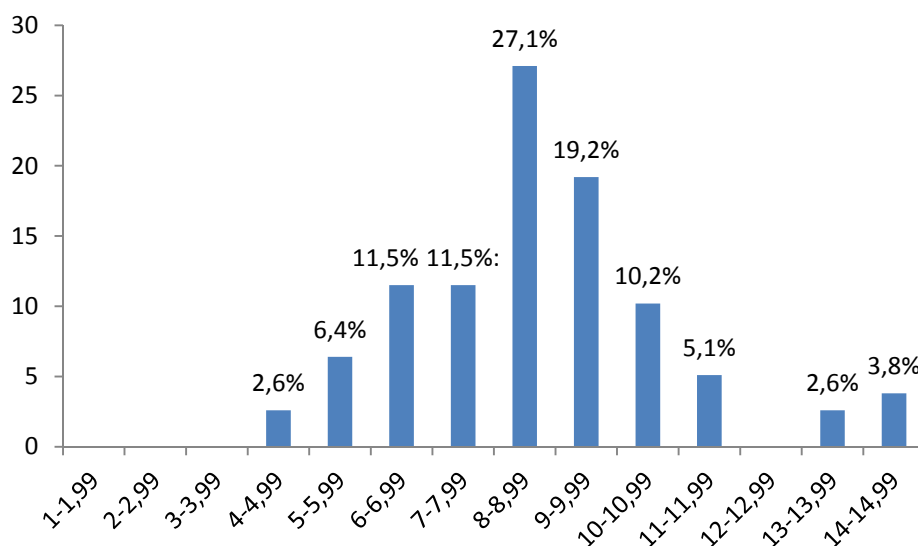


Рис. 4. Гистограмма, характеризующая распределение клеток печени по площади AgNORs на 1 ядро через 5 дней после гипотермии. По оси абсцисс – площадь AgNORs (мкм²) на 1 ядро; по оси ординат процентное содержание клеток

На 14-й день после гипотермии среднее число AgNORs составило $2,0 \pm 0,1$ на 1 ядро. Средняя площадь AgNORs составила $4,2 \pm 0,2$ мкм² на 1 ядро. Средняя площадь 1 AgNORs составила $2,1 \pm 0,1$ мкм². Ядр/яд соотношение составило $0,11 \pm 0,004$ отн. ед. (таблица) (рис. 1г). Анализ гистограммы, характеризующей распределение клеточных элементов по площади AgNORs на 1 ядро, на 14-й день эксперимента показал, что гепатоциты с площадью AgNORs от 1 до 1,99 мкм² составили 1,4%, от 2 до 2,99 мкм² – 22,9%, от 3 до 3,99 мкм² – 32,9%, от 4 до 4,99 мкм² – 18,6%, от 5 до 5,99 мкм² – 10%, от 6 до 6,99 мкм² – 5,7%, от 7 до 7,99 мкм² – 7,1%, от 8 до 8,99 мкм² – 0%, от 9 до 9,99 мкм² – 1,4%, от 10 до 10,99 мкм² – 0%, от 11 до 11,99 мкм² – 0%, от 12 до 12,99 мкм² – 0%, от 13 до 13,99 мкм² – 0% и от 14 до 14,99 мкм² – 0%. При анализе гистограммы видно, что отсутствуют клетки печени с площадью

AgNORs от 10 до 14,99 мкм². Наиболее высокий пик отмечается в области клеточных клонов, содержащих от 3 до 3,99 мкм² на 1 ядро (32,9%). При этом на данном сроке эксперимента возрастает число клонов с небольшой площадью AgNORs от 1 до 4,99 мкм² (рис. 5).

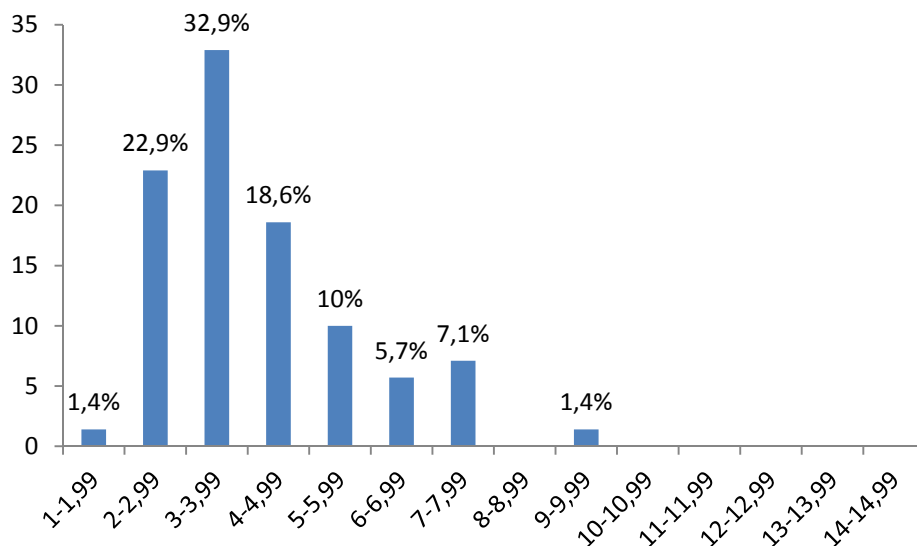


Рис. 5. Гистограмма, характеризующая распределение клеток печени по площади AgNORs на 1 ядро через 14 дней после гипотермии. По оси абсцисс – площадь AgNORs (мкм²) на 1 ядро; по оси ординат процентное содержание клеток

Заключение

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что холодовой стресс оказывает выраженное воздействие на активность ядрышкового аппарата клеточных элементов печени. Сразу после гипотермии в клетках печени экспериментальных животных отмечали уменьшение морфофункциональной активности AgNOR, что может быть связано с повреждающим действием холодового фактора на нуклеолярный аппарат. Далее на 2-й день эксперимента (в период регенерации) наблюдали широкую гетерогенность морфофункциональной активности AgNOR, что, вероятно, было обусловлено процессом образования новых ядрышек. На 5-й день (в период адаптации) количественные и морфометрические параметры AgNOR были наиболее высоки, что является следствием гипертрофии нуклеол, и затем на 14-й день эксперимента морфофункциональная активность ядрышковых организаторов значительно уменьшалась. Таким образом, нуклеолярный аппарат печеночных клеток подвергается повреждению при холодовом воздействии, но в постгипотермическом периоде (в период адаптации) отмечаются явления гипертрофии и амплификации ядрышек, что приводит к нормализации рибосомного синтеза и регенерации гепатоцитов.

Список литературы

1. Бобров И.П., Черданцева Т.М., Климачев В.В. и др. Морфофункциональная активность нуклеолярного аппарата и белка нуклеофозмина (B23) при локализованном и метастатическом раке почки / И.П. Бобров [и др.] // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 10. – С. 1467–1472.
2. Миронова А.А. Цитологический анализ реакции ядрышковой РНК и РНК-связывающих белков на действие окислительного стресса в клетках HeLa / А.А. Миронова, Н.В. Барыкина, О.В. Зацепина // *Цитология*. – 2014. – № 7. – С. 489–499.
3. Амелина И.В. Ядрышкообразующие районы хромосом и адаптация у человека // *Актуальные проблемы физической и специальной подготовки силовых структур*. – 2015. – № 3. – С. 1–8.
4. Grummt I. The nucleolus-guardian of cellular homeostasis and genome integrity // *Chromosoma*. – 2013. – Vol. 122. – P. 487–497.
5. Чучкова Н.Н. Морфофункциональная оценка нуклеолярного аппарата гепатоцитов и лимфоцитов брыжеечных лимфоузлов крыс при измененном характере питания / Н.Н. Чучкова, Н.В. Кормильцева, П.В. Смирнова // *Вестник Удмуртского университета*. – 2016. – № 3. – С. 98–104.
6. Солин А.В. Влияние опиоидных пептидов на морфологические изменения в печени крыс при длительном стрессе / А.В. Солин, Ю.Д. Ляшев // *Научно-практический журнал*. – 2016. – № 4. – С. 132–137.
7. Рябинин В.Е., Полевщикова Е.Е., Пушкарев С.А. и др. Состояние активности ядрышковых организаторов в гепатоцитах крыс после индукции четыреххлористым углеродом цирроза печени и лечения / В.Е. Рябинин [и др.] // *Фундаментальные исследования*. – 2012. – № 11. – С. 1055–1058.
8. Березовский В.А. Реактивность паренхимы печени крыс после введения экзогенного мелатонина / В.А. Березовский, Р.В. Янко, И.Г. Литовка, О.И. Волович // *Украинский морфологический альманах*. – 2012. – № 4. – С. 178–181.
9. Капрелянц А.С. Ультраструктура гепатоцитов после дозированного локального охлаждения / А.С. Капрелянц, Л.Н. Марченко, В.П. Сандомирский // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 1985. – № 10. – С. 486–499.
10. Логинов А.Г. Нарушение и восстановление ультраструктуры ядрышка при повреждении клетки физическими и химическими агентами // *Успехи современной*

биологии. – 1987. – № 1. – С. 81–95.

11. Молодых О.П. Структурные основы адаптивно-компенсаторной реорганизации печени при экстремальных воздействиях: дис. ... докт. мед. наук (03.00.25). – Новосибирск, 2001. – 300 с.

12. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. – Strasburg: Council of Europe, 1986. – 51 p.

13. Бобров И.П., Авдалян А.М., Климачев В.В. и др. Модификация гистохимического метода выявления ядрышковых организаторов на гистологических срезах // Архив патологии. – 2010. – № 3. – С. 35–37.

14. Бобров И.П. Клинико-морфологический и молекулярно-биологический анализ почечно-клеточного рака: диагностическая и прогностическая значимость нуклеологенеза: дис. ... докт. мед. наук (14.03.02). – Новосибирск, 2016. – 272 с.