

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РИБОЗЫ НА УРОВЕНЬ МОЛЕКУЛ СРЕДНЕЙ МАССЫ В КРОВИ РЕАНИМИРОВАННЫХ КРЫС

Золин П.П.¹, Конвой В.Д.^{1,2}, Ефременко Е.С.¹, Старун А.С.¹, Семочкин А.В.¹,
Жукова О.Ю.¹, Мантрова А.И.¹, Домрачев А.А.³

¹ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», Омск, e-mail: zolin_petr@mail.ru;

²ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина», Омск, e-mail: vdconway@bk.ru;

³ООО «Лаборатория», Омск, e-mail: laboratory@omskdom.ru

Целью настоящей работы было выяснить, как изменяется уровень молекул средней массы в крови в раннем постреанимационном периоде, а также проверить возможность влияния на них рибозы у реанимированных и здоровых животных. Эксперименты были выполнены на 42 белых крысах-самцах, которых подвергли 6,5-минутной механической асфиксии с последующей реанимацией. Крысы были подвергнуты эвтаназии через 30 мин после начала реанимации. В цельной крови определяли уровень молекул средней массы при pH = 7 и pH = 1. Среднее значение в группе реанимированных крыс могло изменяться из-за того, что изменялось содержание молекул средней массы у каждого отдельного животного, а также из-за того, что крысы с самой большой концентрацией молекул средней массы погибли, не дожив до забора крови. Установлено, что через 30 мин после начала реанимации уровень молекул средней массы в крови снижается по сравнению с контрольной группой, однако эти различия статистически незначимы. Внутривенное введение D-рибозы (50 мг / кг массы тела) крысам сразу после реанимации, а также здоровым животным существенно не влияло на уровень молекул средней массы в крови.

Ключевые слова: реанимация, кровь, молекулы средней массы, рибоза, эндотоксикоз, данные с пропусками.

THE STUDY OF THE IMPACT OF RIBOSE ON THE LEVEL OF AVERAGE WEIGHT MOLECULES IN THE BLOOD OF RESUSCITATED RATS

Zolin P.P.¹, Convay V.D.^{1,2}, Efremenko E.S.¹, Starun A.S.¹, Semochkin A.V.¹,
Zhukova O.Yu.¹, Mantrova A.I.¹, Domrachev A.A.³

¹FSBEI HE Omsk State Medical University, Omsk, e-mail: zolin_petr@mail.ru;

²FSBEI HE Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Omsk, e-mail: vdconway@bk.ru;

³LLC «Laboratory», e-mail: laboratory@omskdom.ru

The aim of the work is to find out how the level of average weight molecules in the blood change in the early postresuscitation period, and to test the possibility of the influence of ribose on them in the resuscitated and healthy animals. Experiments were performed in 42 white male rats exposed to 6,5 min mechanical asphyxia with following resuscitation. Rats were euthanized 30 minutes after the start of resuscitation. The whole blood was determined by the level of average weight molecules at pH = 7 and pH = 1. The mean value in the group of resuscitated rats could change due to the fact that the average weight molecules in each individual animal varied, and also because the rats with the largest concentration of average weight molecules died before they reached the blood investigation. It was established that 30 minutes after the start of resuscitation, the level of average weight molecules in the blood decreases compared with the control group, however, these differences are statistically insignificant. Intravenous administration of D-ribose (50 mg / kg body weight) to rats immediately after resuscitation, as well as to healthy animals, did not significantly affect the level of average weight molecules in the blood.

Keywords: resuscitation, blood. average weight molecules, ribose, endotoxicosis, missing data.

Для оценки эндогенной интоксикации организма при самых разных патологических состояниях широко используется определение в биологических жидкостях и тканях ряда близких по смыслу лабораторных показателей, именуемых фракцией средней молекулярной массы, или веществами низкой и средней молекулярной массы, или просто «средними молекулами». В последнее время их преобладающим названием стало «молекулы средней

массы» (МСМ) [1-3], которого мы и будем придерживаться.

Наши предыдущие исследования показали, что внутривенное введение крысам растворов рибозы сразу после реанимации благоприятно влияет на ряд биохимических показателей [4; 5]. В продолжение этих работ целесообразно было проверить влияние рибозы на один из интегральных показателей эндотоксикоза – МСМ, поскольку эндотоксикоз играет важную роль в патогенезе постреанимационной болезни, а в доступной литературе мы не обнаружили данных о влиянии рибозы на МСМ и другие показатели эндотоксикоза.

Цель исследования – выяснить, как изменяется уровень МСМ в крови в раннем постреанимационном периоде, а также проверить возможность влияния на него рибозы у реанимированных и здоровых животных.

Материалы и методы

Все исследования проводились в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным и нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF). Эксперименты были выполнены на 42 неинбриденых белых крысах-самцах, которые содержались в виварии на стандартном рационе и свободном доступе к воде. Из них 24 животных, наркотизированных диэтиловым эфиром, подвергли клинической смерти путем 6,5-минутной механической асфиксии с последующей реанимацией, заключающейся в проведении искусственного дыхания и непрямого массажа сердца. 8 крыс из 24 реанимировать не удалось, а 16 успешно реанимированных животных разделили на группы «Реанимация» и «Реанимация + Рибоза». Остальное 18 крыс были подвергнуты не асфиксии, а только контрольным манипуляциям: наркозу, фиксации, интубации; их разделили на группы «Контроль» и «Рибоза».

У животных всех групп через 30 мин после начала реанимации или контрольных манипуляций фиксировали в жидким азоте кровь. Для этого под эфирным наркозом быстро рассекали грудную клетку и отрезали сердце – тем самым производилась эвтаназия животных. Кровь стекала в жидкий азот, застывая в виде шариков. Этую замороженную кровь собирали затем, не размораживая, и обрабатывали как твердую ткань, ведя пересчет показателей не на единицу объема, а на грамм цельной крови. За 25 мин до эвтаназии всем крысам вводили в бедренную вену 0,9%-ный раствор NaCl из расчета $2,5 \text{ мл} \cdot \text{кг}^{-1}$ массы тела. Раствор, предназначенный для групп «Реанимация + Рибоза» и «Рибоза» содержал, кроме того, D-(–)-рибозу производства компании Fluka AG, Buchs SG (Швейцария) в дозе $50 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ массы тела.

В замороженном состоянии гомогенизовали навеску крови в холодной 6%-ной хлорной кислоте (HClO_4), взятой в соотношении 100 мг ткани на 0,4 мл HClO_4 . Хлорнокислый гомогенат центрифугировали в течение 5 мин при 1000 г и 0 °C. Полученный

безбелковый супернатант имеет кислую реакцию ($\text{pH} = 1$). В одной из аликвот нейтрализовали его раствором КОН до $\text{pH} = 7$, выдерживали 15 мин при 0°C и осадок перхлората калия (KClO_4) отделяли центрифугированием при вышеописанных условиях. В другой аликвоте оставляли экстракт кислым ($\text{pH} = 1$). Из полученных таким образом экстрактов крови удаляли органические фосфаты по методике [6], чтобы приблизить биохимические характеристики наших экстрактов цельной крови к характеристикам биологических жидкостей, в которых обычно определяют МСМ – плазмы, сыворотки крови, мочи. Затем при $\text{pH} = 7$ и $\text{pH} = 1$ снимали спектры полученных бесфосфатных экстрактов в области 230-290 нм. Кроме регистрации оптических плотностей ($A_{230} - A_{290}$), вычисляли их соотношения при 250 нм и 260 нм (A_{250}/A_{260}), 280 нм и 260 нм (A_{280}/A_{260}), 290 нм и 260 нм (A_{290}/A_{260}). Известно, что соотношения оптических плотностей МСМ являются информативными показателями при изучении эндотоксикоза [3; 7; 8].

Статистическую обработку цифровых данных проводили при помощи статистического пакета Statistica 6.0 производства компании Stat Soft Inc., США. Вычисляли медиану (M_e), а также нижний и верхний квартили (Q_1 и Q_3) для каждой выборки (группы животных). Затем выполняли сравнение формы распределения двух попарно не связанных выборок по непараметрическому критерию Вальда-Вольфовица, сравнение двух попарно не связанных выборок по их средним тенденциям при помощи критерия Колмогорова-Смирнова в пакете Statistica 6.0, а также при помощи непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни, уровни значимости для которого брали из таблиц [9].

Результаты исследования и их обсуждение. Установлено, что через 30 мин после начала реанимации происходит уменьшение оптической плотности экстрактов крови крыс по сравнению с контролем во всей исследованной области спектра ($A_{230} - A_{290}$) при нейтральном pH (табл. 1 и 2). При этом снижение медианных значений наблюдается при 230 нм в 1,5 раза, при 240 нм в 1,8 раза, при 250 нм в 2,1 раза, при 270 нм в 1,6 раза, при 280 нм в 1,5 раза, и при 290 нм в 1,6 раза. При измерении в кислой среде значительное снижение оптической плотности в группе «Реанимация» по сравнению с группой «Контроль» наблюдается лишь при 240 нм – в 1,5 раза, и при 260 нм – в 1,4 раза (табл. 3 и 4). Во всех случаях статистическая значимость различий не достигает уровня $P = 0,05$ из-за высокой внутригрупповой вариабельности показателя. Снижения внутригрупповой вариабельности в будущих исследованиях можно добиться путем использования линейных животных, характеризующихся меньшей вариабельностью по сравнению с нелинейными крысами, которых мы применяли в настоящей работе.

Таблица 1

Оптическая плотность экстракта крови крыс в области 230-260 нм ($A_{230} - A_{260}$) при $\text{pH} = 7$

через 30 мин после реанимации. Влияние рибозы ($50 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ массы тела)
на реанимированных и здоровых животных

Группы крыс	Длины волн, нм			
	A ₂₃₀	A ₂₄₀	A ₂₅₀	A ₂₆₀
Контроль (n=12)	7,25 (3,75-14,75)	7,00 (2,98-14,50)	4,70 (2,05-10,75)	2,08 (1,70-4,50)
30 мин после реанимации (n=8)	4,93 (2,54-7,50)	3,85 (2,19-7,50)	2,19 (1,94-5,75)	1,81 (1,28-3,07)
30 мин после реанимации + Рибоза (n=4)	5,75 (4,35-11,00)	5,50 (4,35-10,75)	4,15 (3,93-9,60)	1,61 (1,38-7,90)
Рибоза (n=5)	7,00 (4,85-7,50)	7,00 (3,80-7,00)	5,00 (1,98-5,25)	2,05 (1,98-2,90)

Таблица 2
Оптическая плотность экстракта крови крыс в области 270-290 нм (A₂₇₀ - A₂₉₀) при pH = 7
через 30 мин после реанимации. Влияние рибозы ($50 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ массы тела)
на реанимированных и здоровых животных

Группы крыс	Длины волн, нм		
	A ₂₇₀	A ₂₈₀	A ₂₉₀
Контроль (n=12)	1,86 (1,00-2,95)	1,53 (0,88-3,30)	1,21 (0,75-1,75)
30 мин после реанимации (n=8)	1,17 (0,81-1,89)	0,99 (0,68-1,72)	0,75 (0,53-1,49)
30 мин после реанимации + Рибоза (n=4)	0,95 (0,68-6,60)	0,78 (0,59-5,23)	0,58 (0,45-3,65)
Рибоза (n=5)	1,38 (1,30-2,10)	1,05 (1,00-1,70)	0,85 (0,76-1,35)

Таблица 3
Оптическая плотность экстракта крови крыс в области 230-260 нм (A₂₃₀ - A₂₆₀) при pH = 1
через 30 мин после реанимации. Влияние рибозы ($50 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ массы тела)
на реанимированных и здоровых животных

Группы крыс	Длины волн, нм			
	A ₂₃₀	A ₂₄₀	A ₂₅₀	A ₂₆₀
Контроль (n=10)	3,53 (3,15-3,75)	7,88 (4,8-10,20)	5,25 (4,2-6,75)	3,12 (1,26-4,50)
30 мин после реанимации (n=6)	3,45 (1,50-3,75)	5,25 (1,90-7,65)	5,18 (2,00-5,82)	2,16 (1,65-4,50)

30 мин после реанимации + Рибоза (n=4)	3,15 (2,93-5,85)	4,88 (4,20-10,73)	4,35 (3,11-8,55)	1,38 (0,93-4,95)
Рибоза (n=4)	3,53 (2,40-3,90)	6,14 (3,52-9,30)	5,31 (3,50-8,81)	3,75 (1,47-6,38)

Таблица 4

Оптическая плотность экстракта крови крыс в области 270-290 нм (A_{270} - A_{290}) при pH = 1

через 30 мин после реанимации. Влияние рибозы ($50 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ массы тела)

на реанимированных и здоровых животных

Группы крыс	Длины волн, нм		
	A_{270}	A_{280}	A_{290}
Контроль (n=10)	1,62 (0,75-3,00)	1,26 (0,75-2,40)	0,92 (0,54-1,68)
30 мин после реанимации (n=6)	1,68 (0,90-3,30)	1,28 (0,75-2,34)	0,93 (0,60-1,56)
30 мин после реанимации + Рибоза (n=4)	0,98 (0,57-3,86)	0,81 (0,54-2,91)	0,62 (0,44-3,95)
Рибоза (n=4)	1,86 (1,04-3,96)	1,46 (0,84-2,94)	1,04 (0,63-2,22)

Примечания к таблицам 1-4:

результаты в таблицах приводятся в виде: медиана (нижний и верхний квартили), Me (Q_1-Q_3), и выражены в единицах оптической плотности $\cdot \text{г}^{-1}$ сырой массы крови;
n – объем выборки (число крыс в группе).

Как показали наши результаты (табл. 1-4), зависимость спектральных характеристик МСМ от pH в ряде случаев очень сильно выражена, что необходимо всегда учитывать при проведении измерений МСМ. Это объясняется физическими свойствами веществ, входящих в состав МСМ. В качестве примера в таблице 5 мы обобщили литературные данные (в частности, [10; 11]) о положениях максимумов поглощения и величинах отношений A_{250}/A_{260} , A_{280}/A_{260} и A_{290}/A_{260} при кислом и нейтральном pH у пуриновых нуклеозидов и азотистых оснований, являющихся компонентами МСМ.

Таблица 5

Влияние pH на спектральные характеристики пуриновых оснований и нуклеозидов

Пуриновые нуклеозиды и основания	pH	Максимум поглощения (нм)	A_{250}/A_{260}	A_{280}/A_{260}	A_{290}/A_{260}
Аденин	1-2 7	262,5 260,5	0,76 0,76	0,37-0,38 0,13	0,035 0,005
Аденозин	1-2 6-7	257 259-260	0,84-0,85 0,78-0,80	0,21-0,23 0,14-0,16	0,03-0,04 < 0,01
Гуанин	1-2	248; 276	1,37	0,84	0,50

	7	246; 276	1,42	1,04	0,54
Гуанозин	0,7-2	256-257	0,90-1,02	0,66-0,70	0,40-0,50
	6-7	252-253	1,15-1,17	0,66-0,68	0,27-0,30
Гипоксантин	0-2	248	1,40-1,45	0,04-0,07	0-0,005
	6-7	249,5	1,32	0,09-0,092	0,01
Инозин	2-3	248	1,68	0,24-0,25	0,025
	6-7	248-248,5	1,68-1,69	0,25	0,028
Ксантины	2	267	0,57-0,58	0,50-0,61	0,07-0,08
	6-7	267	0,68	0,75	0,20
Ксантозин	2	235; 263	0,75	0,28	0,03
	7-8	248; 278	1,29-1,30	1,10-1,13	0,58
Мочевая кислота	2	231; 283	1,00-1,05	2,68-2,70	2,60
	7		1,70	2,70	3,80

Далее было установлено, что соотношения оптических плотностей A_{250}/A_{260} при $\text{pH} = 1$ в группе «Реанимация» в 2,5 раза ниже уровня группы «Контроль» (при сравнении медиан этих групп), причем это различие статистически значимо по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни ($P = 0,05$). Это наше наблюдение подтверждается литературными данными о повышении A_{260} и снижении A_{250} , полученными при изучении различной патологии. Так, например, статистически значимое повышение оптической плотности МСМ при 260 нм в крови крыс обнаружено при черепно-мозговой травме [12]. Статистически значимое повышение оптической плотности МСМ при 260 нм выявлено в сыворотке крови больных метаболическим синдромом с клиническими проявлениями кардиоваскулярной патологии [8]. Снижение более чем в 4 раза оптической плотности МСМ при 250 нм в эритроцитах крыс было обнаружено при остром отравлении верапамилом [13].

На среднегрупповой уровень МСМ оказывает влияние важный фактор, который обычно выпадает из внимания авторов медицинских исследований. Этот фактор – пропуски в данных, вызванные гибелью части особей от изучаемой патологии [4; 5]. Мы уже отмечали выше, что из 24 крыс, подвергнутых 6,5-минутной асфиксии, нам не удалось реанимировать 8 животных, или 33,3%. Из 16 успешно оживленных крыс (это 66,7% от 24 исходных крыс, подвергнутых асфиксии и реанимации) 10 животных были включены в группу «Реанимация», но из них 2 крысы погибли в течение первых 30 минут постреанимационного периода, не дожив до забора крови. Эти 2 особи составляют 20% от оживленных крыс группы «Реанимация» или 13,3% от исходных животных ($66,7 \cdot 0,2 = 13,3$). Таким образом, итоговое различие между группами «Реанимация» и «Контроль» по пропускам, вызванным гибеллю животных от изучаемой патологии, равно: $33,3 + 13,3 = 46,6\%$.

Как любой биологический показатель, уровень МСМ в организме имеет естественную вариабельность, поэтому исходные значения этого показателя среди крыс, взятых нами в опыт, различались от особи к особи. Учитывая патогенетическое значение МСМ [7; 8; 13],

логично предположить, что животные с изначально высокими содержаниями в организме (а значит и в крови) МСМ имеют меньше шансов выжить, поскольку во время асфиксии и реанимации всегда дополнительно образуются эндотоксины и количество последних может превысить порог, совместимый с жизнью. Таким образом, можно полагать, что 46,6% погибших животных в группе «Реанимация» представлены преимущественно крысами с изначально высокими уровнями МСМ, а 53,4% выживших крыс в основном имели низкие уровни МСМ перед опытом. Удаление из группы высоких цифр приводит к снижению среднегруппового уровня МСМ у выживших животных в группе «Реанимация».

В группе «Реанимация + Рибоза» в течение первых 30 минут постреанимационного периода не погибло ни одной крысы из шести. Таким образом, различие между группами «Реанимация» и «Реанимация + Рибоза» по постреанимационной летальности равно 20%. Эти 20% выживших особей имеют, скорее всего, самые высокие уровни МСМ в группе «Реанимация + Рибоза». D-рибоза, приводя к доживанию крыс до 30 минут после реанимации, тем самым, вероятно, сохраняет в группе «Реанимация + Рибоза» особей с высокими концентрациями МСМ в крови, что приводит к возрастанию среднегруппового уровня МСМ по сравнению с группой «Реанимация» при нескольких длинах волн (табл. 1-4). Введение D-рибозы здоровым животным в дозе $50 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ массы тела не оказывает влияния на $A_{230} - A_{290}$ экстракта крови крыс (табл. 1-4).

Заметим, что во многих исследованиях, в том числе и нашем, имеют место еще и случайные пропуски в данных, например нечаянная утрата биоматериала от нескольких животных. Такие пропуски не влияют на результаты и выводы исследования, если проводить (как мы делали) обработку материала не группа за группой, а в случайном порядке, соблюдая рандомизацию на всех этапах работы.

Литературные данные, собранные в обобщающих публикациях [4; 5; 14], свидетельствуют о благоприятном эффекте D-рибозы при различных патологических состояниях. В том числе этот моносахарид при схеме введения, использованной в настоящей работе ($50 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ массы тела сразу после реанимации), оказывал корrigирующее действие на ряд биохимических и физиологических показателей крыс, реанимированных после 6,5-минутной асфиксии [4; 5]. Однако, как показало настоящее исследование, положительные эффекты D-рибозы в постреанимационном периоде реализуются не через влияние на накопление МСМ в крови, а через воздействие на другие патогенетические механизмы, в частности через процессы, изучавшиеся нами в работах [4; 5; 15].

Заключение

Таким образом, учет пропусков, вызванных изучаемой патологией, позволил объяснить удивительные, на первый взгляд, факты снижения уровня МСМ у

реанимированных животных по сравнению с контрольными, а также повышение МСМ в постреанимационном периоде под влиянием рибозы.

Список литературы

1. Семененко М.П., Фомин О.А., Кононенко С.И., Кузьминова Е.В. Гепатозащитная активность ликверола // Вестник НГАУ. 2017. Т. 4. № 45. С. 116-123.
2. Никольская В.А., Лютослав И.С. Изменение уровня молекул средней массы в сыворотке крови и гомогенате нервной ткани лабораторных животных при воздействии экспериментальной гиперинсулинемии // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Серия: Биология. Химия. 2017. Т. 3 (69). № 3. С. 97-104.
3. Шитов А.Ю. Молекулы средней массы как показатель «гипербарической интоксикации» у водолазов // Альманах клинической медицины. 2013. №. 28. С. 48-52.
4. Золин П.П., Лебедев В.М., Конвой В.Д. Математическое моделирование биохимических процессов с применением регрессионного анализа: монография. Омск: Изд-во Ом. гос. ун-та, 2009. 344 с.
5. Золин П.П. Постреанимационные нарушения обмена гипоксантина и их коррекция: дис. ... канд. мед. наук. Омск, 2002. 250 с.
6. Золин П.П., Конвой В.Д. Методологические и методические подходы к изучению пуринового обмена при энергодефицитных состояниях. Омск: Омский мед. ин-т, 1993. 34 с.
7. Богданов М.В., Воронцова Н.Л., Матвеева В.Г., Головкин А.С., Ларионов М.В., Григорьев Е.В. Динамика показателей окислительного стресса и эндогенной интоксикации в венечном синусе и периферической крови у пациентов с ИБС во время аортокоронарного шунтирования // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2013. № 4. С. 65-70.
8. Гордиенко А.И., Химич Н.В., Белоглазов В.А., Стилиди М.И., Бакова А.А. Характеристика уровня эндогенной интоксикации у пациентов, страдающих метаболическим синдромом в сочетании с кардиоваскулярной патологией // КЖЭКМ. 2012. Т. 2. № 1-2 (5-6). С. 28-30.
9. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л.: Медицина, 1973. 143 с.
10. Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry / eds. J.C. Lindon, G.E. Tranter, D.W. Koppenaal. 3rd ed. Amsterdam: Academic Press, 2017. 3584 p.
11. Henderson J.F., Paterson A.R.P. Nucleotide metabolism. An introduction (Kindle Edition).

Burlington: Elsevier Science, 2014. 304 p.

12. Жиляев С.А., Штырголь С.Ю. Экспериментальное исследование влияния корвитина и липофлавона на показатели прооксидантно-антиоксидантного баланса и эндогенной интоксикации при черепно-мозговой травме // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. 2013. № 18 (161). Вып. 23. С. 146-151.
13. Яцинюк Б.Б., Никонова Л.Г., Брусин К.М. Характер изменений веществ низкой и средней молекулярной массы при острых экспериментальных отравлениях верапамилом // Уральский медицинский журнал. 2009. № 6 (60). С. 59-62.
14. Чигринский Е.А. Антиоксидантная система семенников крыс при физических нагрузках. Saarbrücken: LAP LAMBERT, 2012. 152 с.
15. Конвой В.Д., Золин П.П. Место острого нарушения пуринового обмена в нозологии // Патогенез и фармакокоррекция экстремальных и терминальных состояний: Материалы научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения проф. И.Б. Мажбича (Омск, 12 сентября 1995 г.). Омск: Омская государственная медицинская академия, 1995. С. 24.