

Комбинированное фармакологическое лечение контактного отморожения в эксперименте

В.А. ЛАЗАРЕНКО, Е.Б. АРТЮШКОВА, В.Н. МИШУСТИН, Л.Л. КВАЧАХИЯ,
И.А. МОНОВЦОВ, А.Л. ЧИГУНАДЗЕ, Е.В. АРТЮШКОВА

Курский государственный медицинский университет, Курск, Российская Федерация

Актуальность Расширение знаний о патогенезе отморожений и появление новых медикаментозных препаратов делают возможным улучшение результатов лечения отморожений. Это может быть достигнуто, в частности, за счет введения в состав комплексной терапии комбинации селективного агониста дельта-опиоидных рецепторов (DSLET) и серотонинергического средства (серотонина адипината), обладающей анальгетической, иммуномодулирующей, антиоксидантной и противовоспалительной активностью.

Цель исследования Изучение фармакологической коррекции контактного отморожения с помощью комбинированного лечения DSLET и серотонина адипината в эксперименте.

Материалы и методы Исследование выполнено на 200 половозрелых крысах-самцах линии «Wistar». Контактное отморожение моделировали с помощью предварительно охлажденной в жидком азоте металлической гирьки размером 3,5-3,0 см, которую прикладывали к депилированной коже спины крысы на 3 минуты. Наряду с проведением стандартной антибактериальной терапии (контрольная группа) животные опытных групп получали лечение DSLET (10 мкг/кг в/б), серотонина адипинатом (4,5 мг/кг в/б) или их комбинацией в указанных дозах. На 1, 3, 7, 14-е сутки после холодовой травмы у всех животных оценивали уровень микроциркуляции с помощью лазерного доплеровского флоуметра и динамику биохимических показателей крови (малонового диальдегида (МДА), интерлейкина 6 (ИЛ-6), фактора некроза опухоли- α (ФНО- α), супероксид-дисмутазы (СОД), каталазы).

Результаты и их обсуждение Моделирование контактного отморожения в контрольной группе приводило к снижению уровня микроциркуляции в пограничной некрозу зоне на 1, 3, 7, 14-е сутки по сравнению с интактной группой животных. Контактное отморожение вызывало развитие оксидативного стресса и воспалительной реакции, что подтверждалось характерной динамикой биохимических маркеров в сыворотке крови нелеченых животных, при этом отмечалось достоверное повышение концентрации МДА, ИЛ-6, ФНО- α и снижение активности СОД, также отмечалось компенсаторное повышение активности одного из основных ферментов антиоксидантной защиты – каталазы. Включение в комплекс лечения комбинации DSLET (10 мкг/кг) и серотонина адипината (4,5 мг/кг) на фоне антибактериальной терапии цефотаксимом в дозе 0,085 г/кг, на 14-е сутки после моделирования патологии приводило к увеличению уровня микроциркуляции на 27,2 % по сравнению с группой, не получавшей лечение ($p < 0,05$). Комбинированное введение препаратов приводило к снижению концентрации МДА, снижению уровня провоспалительных цитокинов ИЛ-6, ФНО- α на 1, 3, 5, 7-е сутки, а также к повышению активности каталазы и СОД на 7, 14-е сутки экспериментального исследования.

Выводы Проведенное исследование подтверждает наибольшую эффективность комбинированного использования DSLET и серотонина адипината, по сравнению с монотерапией, на модели экспериментального контактного отморожения.

Ключевые слова Контактное отморожение, микроциркуляция, диагностика, лечение, экспериментальное исследование

Combined Pharmacological Correction of Experimental Frostbite

V.A. LAZARENKO, E.B. ARTIUSHKOVA, V.N. MISHUSTIN, L.L. KVACHAKHIA, I.A. MONOVTSOV,
A.L. CHIGUNADZE, E.V. ARTIUSHKOVA

Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation

Relevance Increased knowledge of the pathogenesis of frostbite and new pharmacological agents make it possible to improve the treatment results of local cold injury. This can be achieved, in particular, through the introduction of drug combination - the selective agonist of the delta-opioid receptors (DSLET) and the serotonergic agent (serotonin adipinate) which possesses analgesic, immunomodulatory, antioxidant and anti-inflammatory activity.

The purpose of the study To investigate the effect of combined pharmacological treatment by DSLET and serotonin adipinate in experimental local frostbite.

Materials and methods The study was conducted on 200 male Wistar rats. The local frostbite was inflicted with a preliminary cooled in liquid nitrogen metal plummet size 3.5-3.0 cm pressing against the shaved skin of the back during 3 min. Alongside with the standard antibiotic therapy (control) animals of the experimental groups were treated DSLET (10 mkg/kg intra-peritoneally (IP)), serotonin adipinate (4.5 mg/kg IP) or its combination in indicated doses. Using the method of laser Doppler flowmetry the level of microcirculation was assessed as well as the biochemical changes in serum (malondialdehyde (MDA), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), superoxide dismutase (SOD), catalase) in all animals at 1, 3, 7 and 14 days after cold injury.

Results and their discussion The model of local frostbite in control group resulted in reduction of microcirculation in necrosis boundary area at 1, 3, 7 and 14 days compared to the intact animals. The local frostbite injury induced oxidative stress and inflammation that were confirmed by typical dynamics of serum biochemical markers of non-treated rats while the significant increase the concentration of MDA, IL-6, TNF- α and decrease SOD activity were recognized. Also compensatory enhancement of catalase activity – one of the major antioxidant enzymes was observed. As well additional administration of drug combination DSLET (10 mkg/

kg) with serotonin adipinate (4.5 mg/kg) to antibacterial treatment by cefotaxime in dose 0.085 g/kg increased the microcirculation by 27.2% compared to the non-treated group ($p < 0.05$) at day 14 after damage due to frostbite injury in rats. A curative beneficial effect caused by combined pharmacological treatment of local frostbite was also confirmed by decrease of MDA concentration and pro-inflammatory cytokines IL-6 level at 1, 3, 5 and 7 days and by enhance of catalase and SOD activities at day 7 and 14 following experimentally induced frostbite.

Conclusion Compared to monotherapy, combined usage of DSLET and serotonin adipinate provides a better pharmacological treatment efficiency in experimental model of local frostbite.

Key words Local frostbite, microcirculation, diagnostics, treatment, experimental study

Актуальность

Отморожения представляют собой спектр повреждений от необратимых разрушений клеток до обратимых изменений клеток, наблюдаемых после согревания. Эти изменения включают увеличение отека тканей, сосудистого стаза и распространяющегося тромбоза, ведущего к развитию микроциркуляторного коллапса и дальнейшего некроза ткани [2,3,6,7,8,9].

В этой связи несомненный интерес представляет изучение возможности дополнительной фармакологической коррекции отморожений препаратами из группы опиоидных пептидов и серотонинергических средств. По данным литературы известно, что механизм фармакологического действия опиоидных пептидов обусловлен их анальгетическим действием, что приводит к ограничению болевого афферентного потока при длительном введении препарата и способствует мобилизации регуляторных систем организма [5]. В то же время доказаны многочисленные точки приложения серотонина адипината. Так, под его воздействием происходит стимулирующее действие на гладкую мускулатуру сосудов, снижается интенсивность свободнорадикального окисления, увеличивается стойкость капилляров, нормализуется функция нейтрофилов при различной патологии [4].

Таким образом, несмотря на широкое применение лекарственной терапии при отморожениях, использование селективного агониста дельта опиоидных рецепторов DSLET и серотонинергического средства - серотонина адипината позволяет раскрыть перспективу их целенаправленного изучения в качестве дополнения к существующим методам лечения.

Целью исследования является изучение фармакологической коррекции контактного отморожения с помощью комбинированного лечения DSLET и серотонина адипината в эксперименте.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 200 половозрелых крысах-самцах линии «Wistar», массой тела 250 г. Для исследования взяты крысы без внешних признаков заболевания, прошедшие карантинный режим. Животные во время эксперимента содержались в виварии Курского государственного медицинского университета в одинаковых условиях на стандартном пищевом режиме. Операции и все манипуляции с крысами

проводились в условиях общего обезболивания, путем внутривентриального введения хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг животного.

Эксперимент проводился в соответствии с Правилами лабораторной практики (Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики»).

Этические принципы обращения с лабораторными животными соблюдались в соответствии с «European Convention for the protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. CETS No. 123».

В исследовании все животные были разделены на три серии: интактную, контрольную и опытную.

У крыс контрольной серии (40 животных) после наступления наркотического сна моделировали отморожение с помощью металлической гирьки размером 3,5-3,0 см, которую предварительно охлаждали в жидком азоте, а потом прикладывали к депилированной коже спины крысы на 3 минуты по методу Бойко В.В., 2010 [2]. После эксперимента наблюдали за общим состоянием животных. Оценивали состояние участков кожи спины крыс, подверженных отморожению. Моделирование повреждения позволило получить контактное отморожение 3 степени. У всех животных контрольной серии проводили исследование микроциркуляции и биохимических показателей крови на 1, 3, 7, 14-е сутки после холодовой травмы.

Измерение микроциркуляции на спине экспериментального животного проводились помощью лазерного доплеровского флуометра (ЛДФ) фирмы «BiopacSystems» MP -100 с датчиком TSD-144 и программы Acqknowledge 3.8.1. [1].

Измерение показателей микроциркуляции выполнялось на пограничной некрозу зоне в 6 точках. Показатели имели вид ЛДФ-грамм и выражались в перфузионных единицах (п.е.). Запись проводилась в течении 30 сек. в каждой точке. Из полученных значений выводили среднее, которое вносили в протокол исследования.

Для биохимического исследования крови производился забор крови крыс на 1, 3, 7, 14-е сутки после моделирования отморожения. В комплекс биохимических исследований входило определение уровня: малонового диальдегида (МДА), интерлейкина 6 (ИЛ-6),

фактора некроза опухоли – α (ФНО- α), супероксида-димутаза (СОД) и каталазы в сыворотке крови животных.

У крыс интактной серии без моделирования отморожения (40 животных) также производили исследование микроциркуляции и биохимических показателей (МДА, ИЛ-6, ФНО- α , СОД, каталазы) на 1, 3, 7, 14-е сутки.

Крысы опытной серии (120 животных) после моделирования отморожения были разделены на 3 группы.

Крысам первой группы (40 животных) сразу после моделирования отморожения вводили селективный агонист дельта опиоидных рецепторов DSLET внутривенно (в/в) в дозе 10 мкг на 1 кг массы тела на 1, 3, 5 и 7-е сутки. Исследуемый пептид DSLET был синтезирован в лаборатории синтеза пептидов Института экспериментальной кардиологии КНЦ РАН.

Крысам второй группы (40 животных) сразу после моделирования отморожения вводили серотонинергическое средство - серотонинаадипинат в/в в дозе 4,5 мг на 1 кг массы тела на 1, 3, 5 и 7-е сутки, производства НПЦ «ФАРМЗАЩИТА», Россия.

Крысы третьей группы (40 животных) получали комбинированное лечение DSLET в дозе 10 мкг/кг и серотонина адипинат в дозе 4,5 мг на 1 кг массы тела в/в, сразу после моделирования отморожения, а также на первые, третьи, пятые и седьмые сутки.

У всех животных опытной серии проводили исследование микроциркуляции и биохимических показателей (МДА, ИЛ-6, ФНО- α , СОД, каталазы) крови на 1, 3, 7, 14-е сутки после холодовой травмы.

Животные всех исследуемых серий (контрольная и опытная) получали в/м антибактериальную терапию путем введения цефотаксима в дозе 0,085 г на 1 кг массы тела, ежедневно в течение 7 дней.

В качестве критериев эффективности лечения использовались: динамика показателей уровня микроциркуляции, оценка биохимических показателей.

Достоверность наблюдавшихся при действии исследованных препаратов изменений параметров, как абсолютных, так и в процентах от исходного уровня, определяли путем расчета средней арифметической (M), ошибки средней арифметической ($\pm m$) и оценки достоверности различий сравнимых параметров между группами с использованием t-test для групп с разными дисперсиями. Достоверными считались различия сравниваемых параметров при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Моделирование отморожения в группе экспериментальных животных приводило к значительным нарушениям кровотока в пограничной некрозу зоне.

На 1, 3, 7 и 14-е сутки исследования в контрольной серии отмечалось достоверное снижение показателей микроциркуляции, которые отличались от интактной группы на 77,7, 69,2, 51,4 и 34,4% соответственно. Вос-

становление уровня микроциркуляции в контрольной группе началось с 7-х суток исследования, однако до 14-х суток оставалось достоверно ниже значения, зарегистрированного в группе интактных животных: $74,89 \pm 2,17$ и $114,06 \pm 2,78$ п.е., соответственно ($p > 0,05$).

При оценке уровня микроциркуляции в группах опытной серии было выявлено, что введение исследуемых препаратов и их комбинации способствует повышению уровня микроциркуляции в пограничной некрозу зоне. Так, введение DSLET в дозе 10 мкг/кг сопровождалось повышением показателей ЛДФ на всех сроках исследования, а к 14-м суткам достоверно отличалось от контрольной группы на 12,8 %.

В группе животных, получавших серотонина адипинат в дозе 4,5 мг/кг отмечалось достоверное увеличение показателей микроциркуляции на 1 и 3-х сутках эксперимента по сравнению с контрольной серией животных: на 45,9 и на 39,8%, соответственно.

Комбинированное применение DSLET в дозе 10 мкг/кг и серотонина адипината в дозе 4,5 мг/кг, привело к увеличению показателей ЛДФ до значений, достоверно отличающихся ($p < 0,05$) от таковых в контрольной серии на соответствующих сроках: 1-е сутки – на 53,7%, 3 сутки – на 37,2%, 7-е сутки – на 32,3%, 14 сутки – на 27,2%. Обращает на себя внимание, что к концу эксперимента значение микроциркуляции в группе животных, получавших комбинированное лечение не отличалось от интактной группы: $103,01 \pm 6,50$ и $114,06 \pm 2,78$ п.е., соответственно ($p > 0,05$).

Развитие отморожения подтверждалось динамикой биохимических маркеров воспаления и оксидативного стресса. Так, в сыворотке крови нелеченых животных отмечалось достоверное повышение концентрации МДА на 44,7% в 1-е сутки, на 28,6% – 3-и, на 30,2% – 7-е сутки и на 20,3% – 14-е. Также отмечалось компенсаторное повышение активности одного из основных ферментов антиоксидантной защиты - каталазы на 22,7% - 3 сутки эксперимента, с последующим его снижением на 7 и 14-е сутки относительно группы интактных животных.

При использовании комбинированного лечения, включающего DSLET в дозе 10 мкг/кг и серотонина адипинат в дозе 4,5 мг/кг, прослеживалась нормализация концентрации МДА на 7 и 14 сутки эксперимента на 20% и 27,7% соответственно ($p < 0,05$).

Важно отметить влияние DSLET и серотонина адипината при монотерапии в комбинации на повышение активности каталазы на протяжении всего эксперимента, что способствовало адекватной антиоксидантной защите организма животных (рис. 1).

В ходе дальнейших исследований установлена эффективность лечения отморожения на фоне введения комбинации исследуемых препаратов, что подтверждалось снижением уровня провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ФНО- α . Важно отметить, что уже к 3-м суткам эксперимента имело место достоверное снижение ИЛ-6 на 53,3% и ФНО- α на 43,6% (рис. 2, рис. 3). Вероятно, это результат аддитивного фармакологического эффекта исследуемых препаратов, в том числе за счет наиболее эффективного вклада

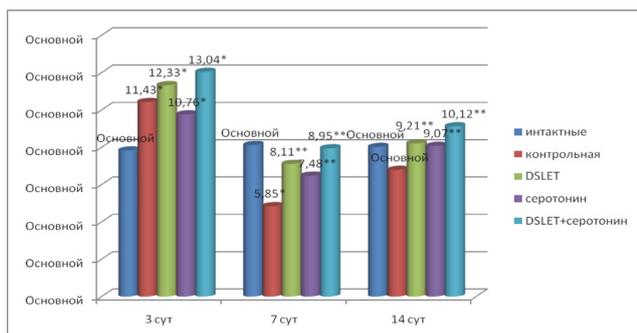


Рис. 1. Влияние DSLET 10 мкг/кг, серотонина адипината 4,5 мг/кг, комбинации DSLET 10 мкг/кг и серотонина адипината 4,5 мг/кг на активность каталазы при моделировании отморожения (Мкат/л). * - при $p < 0,05$ в сравнении с интактной группой, ** - при $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой.

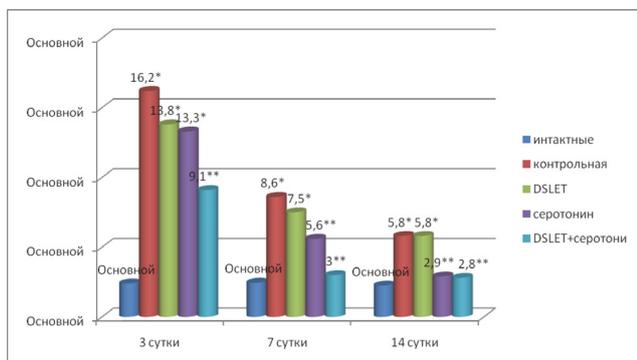


Рис. 2. Влияние DSLET 10 мкг/кг, серотонина адипината 4,5 мг/кг, комбинации DSLET 10 мкг/кг и серотонина адипината 4,5 мг/кг на концентрацию ФНО- α при моделировании отморожения (пг/мл). * - при $p < 0,05$ в сравнении с интактной группой, ** - при $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой.

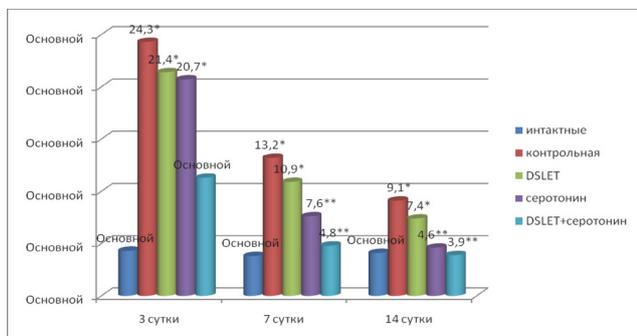


Рис. 3. Влияние DSLET 10 мкг/кг, серотонина адипината 4,5 мг/кг, комбинации DSLET 10 мкг/кг и серотонина адипината 4,5 мг/кг на активность ИЛ-6 при моделировании отморожения (пг/мл). * - при $p < 0,05$ в сравнении с интактной группой, ** - при $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой.

серотонина адипината в снижении цитокинов на 7 и 14-е сутки эксперимента (рис. 2, рис. 3). В ходе дальнейших

экспериментальных исследований установлено, что у крыс с моделью отморожения через 24 часа в сыворотке крови наблюдалось снижение активности СОД, что выражалось в более низких значениях – 8,25 усл.ед/мл, по сравнению с интактными животными – 12,62 усл.ед/мл ($p < 0,05$). Данная тенденция сохранялась на 3 и 7-е сутки включительно и нормализовалась к 14-м суткам эксперимента. При введении DSLET снижение активности СОД было выражено в меньшей степени по сравнению с группой нелеченых животных. Так, на фоне введения DSLET на 3, 7-е сутки исследования имел место подъем активности СОД на 8,3, и на 26,45% ($p < 0,05$) соответственно в сравнении с контрольной серией. При комбинированном введении препаратов было выявлено более выраженное повышение СОД на 7-е сутки – 28,7%, по сравнению с контрольной серией животных. Полученные нами результаты при моно- и комбинированной терапии подтвердили предположение об аддитивном противовоспалительном, антиоксидантном действии исследуемых препаратов на модели контактного отморожения.

Таким образом, несмотря на широкое применение лекарственной терапии при отморожениях, использование селективного агониста дельта опиоидных рецепторов DSLET и серотонинергического средства - серотонина адипината позволяет раскрыть перспективу их целенаправленного изучения в качестве дополнения к существующим методам лечения.

Выводы

1. Предложенная модель отморожения у экспериментальных животных приводила к снижению уровня микроциркуляции в пограничной некрозу зоне, а также вызывала развитие воспалительной реакции, оксидативного стресса, выражающихся в характерной динамике биохимических маркеров: повышении уровня ИЛ-6 и ФНО- α , повышении концентрации МДА, снижении активности СОД и каталазы.

2. Включение в комплекс лечения внутрибрюшинное введение комбинации DSLET в дозе 10 мкг/кг и серотонина адипинат в дозе 4,5 мг/кг на 1, 3, 5 и 7-е сутки после моделирования отморожения, приводило к достоверному увеличению показателей микроциркуляции на всех сроках исследования по сравнению с нелечеными животными.

3. Комбинированное лечение DSLET в дозе 10 мкг/кг и серотонина адипинатом в дозе 4,5 мг/кг приводило к снижению концентрации МДА, уровня провоспалительных цитокинов ИЛ-6, ФНО- α на 1, 3, 5 и 7-е сутки после отморожения способствовало повышению активности каталазы, СОД к 7 и 14-м суткам эксперимента.

Список литературы

1. Артюшкова Е.Б., Пашков Д.В., Цоколаева З.И., и др. Сравнительная оценка ангиогенного эффекта L-аргинина и сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) при экспериментальной ишемии конечности. Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. 2009; 1: 46-52.
2. Бойко В.В., Миловидова А.Э., Яновская Л.Г. и др. Изучение морфологических особенностей в тканях экспериментальных животных при моделировании холодовой травмы. Вестник морфологии. 2010; 16(3): 526-528.
3. Иванов В.А., Витковский Ю.А., Михайличенко М.И. и др. Содержание цитокинов в крови больных при местной холодовой травме Медицинская иммунология. 2008; 1: 89-92.
4. Лазарев Е.В. Использование серотонина адипината для повышения эффективности консервативной терапии критической ишемии нижних конечностей атеросклеротического генеза: дис... канд. мед.наук. Курск 2004; 15-30.
5. Ляшев Ю.Д. Опиоидные пептиды как регуляторы репаративного остеогенеза: дис... докт. мед.наук. Курск 2002; 55.
6. Arford, S. Treatment of frostbite: a cold-induced injury S. Arford J. Wound Ostomy Continence Nurs. 2008; Vol. 35: 6: 625-630.
7. Bilgic S., Ozkan H., Ozenc S. et al. Treating frostbite Can FamPhysican. 2008 Mar; 54(3):361-3.
8. Wittmers L.E. Jr. Pathophysiology of cold exposure Minn Med. 2001 Nov; 84(11):30-6
9. Yang Z.R., Liu J.Y., Yan P.H. Effect of cold acclimation on hemorheological behavior in rats with frostbite Clin-HemorheolMicrocirc. 2003; 29(2): 103-9.

Поступила 17.10.2012 г.

References

1. Artiushkova E.B., Pashkov D.V., Tsokolaeva Z.I., i dr. Comparative evaluation of the angiogenic effect of L-arginine and vascular endothelial growth factor (VEGF) in experimental ischemia of the limb. *Rossiiskii mediko-biologicheskii vestnik im. akademika I.P. Pavlova*, 2009; 1: 46-52. – (In Russian).
2. Boiko V.V., Milovidova A.E., Ianovskaia L.G. i dr. The study of the morphological features in the tissues of experimental animals in the simulation of cold injury. *Vestnik morfologii*, 2010; 16(3): 526-528. – (In Russian).
3. Ivanov V.A., Vitkovskii Yu.A., Mikhailichenko M.I. i dr. The content of cytokines in the blood of patients at the local cold injury. *Meditsinskaia immunologiya*, 2008; 1: 89-92. – (In Russian).
4. Lazarev E.V. Ispol'zovanie serotoninina adipinata dlia povysheniia effektivnosti konservativnoi terapii kriticheskoi ishemii nizhnikh konechnostei ateroskleroticheskogo genеза. Dis. kand. med.nauk [The use of serotonin adipinate to improve conservative therapy of critical ischemia of the limbs of atherosclerotic genesis. Cand. med. sci. diss.] Kursk, 2004. 30 p. – (In Russian).
5. Liashev Yu.D. *Opioidnye peptidy kak regulatory reпаратivnogo osteogeneza. Dis. dokt. med. nauk* [Opioid peptides as regulators of reparative osteogenesis: Dr. med. sci. diss.]. Kursk 2002; 55 – (In Russian).
6. Arford, S. Treatment of frostbite: a cold-induced injury. *J. Wound Ostomy Continence Nurs.*, 2008; 35: 6: 625-630.
7. Bilgic S., Ozkan H., Ozenc S. et al. Treating frostbite. *Can. Fam. Physican.*, 2008 Mar; 54(3):361-3.
8. Wittmers L.E. Jr. Pathophysiology of cold exposure. *Minn. Med.*, 2001 Nov; 84(11): 30-6.
9. Yang Z.R., Liu J.Y., Yan P.H. Effect of cold acclimation on hemorheological behavior in rats with frostbite. *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, 2003; 29(2): 103-9.

Received 17.10.2012

Информация об авторах

1. Лазаренко Виктор Анатольевич – д.м.н., проф., зав. кафедрой хирургических болезней, ректор Курского государственного медицинского университета; e-mail: kurskmed@mail.ru
2. Артюшкова Елена Борисовна – д.б.н., директор НИИ Экологической медицины Курского государственного медицинского университета; e-mail: eartyushkova@mail.ru
3. Мишустин Владимир Николаевич – д.м.н., проф. кафедры хирургических болезней ФПО Курского государственного медицинского университета; e-mail: vladimirshf2011@mail.ru
4. Квачахия Леван Лорикович – к.м.н., асс. кафедры хирургических болезней ФПО Курского государственного медицинского университета; e-mail: levan77@yandex.ru
5. Моновцов Игорь Алексеевич – к.м.н., доц. кафедры хирургических болезней ФПО Курского государственного медицинского университета; e-mail: moni-1@yandex.ru
6. Чигунадзе Александр Леванович – очный аспирант кафедры хирургических болезней ФПО Курского государственного медицинского университета; e-mail: ales-sio18@mail.ru
7. Артюшкова Екатерина Вячеславовна – к.м.н., научный сотрудник НИИ Экологической медицины Курского государственного медицинского университета; e-mail: savens@mail.ru