

ИНТЕНСИВНОСТЬ ИНДУЦИРОВАННОГО КАРБОНИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ МОЛОКА КАК ИДЕНТИФИКАТОР ИХ СОХРАННОСТИ

Г.Г. Крышкина

аспирант, Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина (г. Омск, Россия)
E-mail gg.kryshkina@omgau.org

В.Е. Высокогорский

д.м.н., профессор, Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина (г. Омск, Россия)

М.А. Соколова

аспирант, Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина (г. Омск, Россия)

Н.В. Стрельчик

к.в.н., доцент, Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина (г. Омск, Россия)

Актуальность. Сохранение антиокислительной защиты молока имеет важное значение для сбережения биологических свойств и вкусовых качеств продукта. Наиболее чувствительным маркером активации свободнорадикальных процессов является окислительная модификация белков, что послужило основанием для определения её уровня при хранении молока.

Цель исследования. Определение интенсивности спонтанной и металл-катализируемой окислительной модификации белков в ранние сроки хранения молока.

Материал и методы. Материалом исследования служили образцы питьевого пастеризованного молока. Для выявления состояния процессов окислительной модификации белков в ранние сроки хранения пробы молока сохраняли при доступе кислорода и температуре 3–4 °С. В отдельные пробы молока добавляли дигидрохверцетин в дозе 0,25 мг/л. Образование дериватов карбонильных производных аминокислот определяли по их реакции с 2,4-динитрофенилгидразином с регистрацией динитрофенилгидразонов на спектрофотометре UNICO 2800 при различных длинах волн: от 230 до 535 нм.

Результаты. При определении спонтанной окислительной модификации белков через 48 ч хранения молока в аэробных условиях не выявлено существенного накопления карбонильных производных белков. При индукции свободнорадикальных процессов добавлением ионов железа и пероксида водорода общее содержание всех продуктов окислительного карбонилирования белков увеличивается через 48 ч хранения молока в аэробных условиях на 53%, как за счет производных альдегидов, так и кетонов. Индукция окислительных процессов железом приводит к образованию карбонильных производных аминокислот нейтрального и основного характера. Через 48 ч хранения молока наблюдается увеличение резервно-адаптационного потенциала и для альдегид- и для кетон-динитрофенилгидразонов. Дигидрохверцетин в дозе 0,25 мг/л тормозит активацию металл-катализируемой модификации белков молока через 48 ч хранения молока в аэробных условиях при температуре 3–4 °С.

Выводы. Показатели уровня карбонильных производных белков молока могут служить дополнительным маркером для оценки биологической ценности и сроков хранения молока.

Ключевые слова: окислительная модификация белков, окислительный стресс, молоко, дигидрохверцетин, альдегид-динитрофенилгидразоны, кетон-динитрофенилгидразоны.

Для цитирования: Крышкина Г.Г., Высокогорский В.Е., Соколова М.А., Стрельчик Н.В. Интенсивность индуцированного карбонилирования белков молока как идентификатор их сохранности. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2021;24(11):9–14. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-11-02>

Разнообразные технологические, производственные факторы значительно изменяют биологические и пищевые свойства молока и молочных продуктов. Эти изменения вызваны разрушением и снижением, прежде всего, уровня микронутриентов: витаминов, микроэлементов, антиоксидантов. Особую актуальность имеет дефицит антиоксидантов. Их основным источником являются овощи и фрукты. Однако во многих регионах Российской Федерации потребление плодов и ягод значительно ниже минимальной годовой нормы,

которая должна составлять 90–100 кг на душу населения, а реальное потребление в год составляет всего 53 кг [1]. Необходимость постоянного поступления антиоксидантов с продуктами питания возрастает при воздействии неблагоприятных экологических факторов, в условиях стресса. Развитие окислительного стресса, обусловленного нарушением антиокислительной защиты, наблюдается при самых разнообразных заболеваниях [2]. Это подтверждает необходимость постоянного контроля уровня антиоксидантов и изучения влия-

ния различных факторов на антиокислительную активность продуктов питания.

Одним из постоянных пищевых источников антиоксидантов может служить молоко и молочные продукты. Однако пастеризация, ультрапастеризация снижают антиокислительную активность молока [3, 4]. Свежее пастеризованное молоко, приготовленное с применением микрофилтрации, обладает большей антиокислительной активностью, чем молоко, полученное с применением высокотемпературной пастеризации [5]. При различных условиях пастеризации антиокислительная активность молока изменяется в различной степени. По данным Ю.В. Щербаковой с соавт. (2015) при кратковременной пастеризации в результате разрушения жировых глобул молока в плазму выходят дополнительные полипептиды, обладающие антирадикальными свойствами, что может повысить антиоксидантные свойства пастеризованного молока [6].

Сохранение антиокислительной защиты молока играет важную практическую роль, поскольку активация окислительных процессов приводит к сильному изменению вкусовых качеств и ухудшению питательных свойств продукта. Баланс про- и антиоксидантов молока определяет его окислительную стабильность, значительную роль в поддержании которой играет степень ненасыщенности жирных кислот, содержание ионов металлов переменной валентности и уровень таких антиоксидантов, как токоферолы и каротиноиды [7]. Кроме того, условия переработки, упаковки и хранения также влияют на срок сохранности продукта, его вкусовых качеств, так как основными механизмами ухудшения качества молока является окисление кислородом, индуцированное светом [8].

Предложены различные методы определения окислительных повреждений молока и молочных продуктов, среди которых чаще всего применяются критерии окисления липидов – уровень липидных гидропероксидов, ТБК-тест и др. По данным К. Smet с соавт. (2008), в молоке при воздействии света образование гидроперекисей липидов появляется только через 7 дней, в то время как антиоксидантная способность молочной сыворотки снижается уже в первые дни хранения, что позволило сделать вывод о более высокой чувствительности маркеров антиоксидантной способности для оценки сохранности биологических свойств молока [9].

Важнейшая роль в метаболических процессах белков, их высокая чувствительность к свободным

радикалам, позволяет рассматривать белки как главные мишени в действии активных форм кислорода [10]. Определение продуктов окислительной модификации белков (ОМБ) считается наиболее надежным показателем активации свободно-радикальных процессов, тем более что карбонильные производные белков являются стабильными продуктами и образуются не только за счет окисления активными формами кислорода, но и при взаимодействии продуктов свободнорадикального окисления липидов с остатками аминокислот в составе белков [10]. Таким образом, выяснение возможности использования ОМБ для оценки сохранности биологических свойств молока представляет несомненную актуальность.

Ц е л ь и с с л е д о в а н и я – определение интенсивности спонтанной и металлкаatalизированной окислительной модификации белков в ранние сроки хранения молока.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили шесть образцов питьевого пастеризованного молока с массовой долей жира 2,5%, полученные на молокоперерабатывающем предприятии «Манрос-М» (Омский филиал АО «Вимм-Билль-Данн») от значительного количества животных, в различные дни одного сезона (весной). Определяли в трехразовой повторности уровень карбонильных производных белков в одной и той же пробе молока до и через 48 ч хранения и при добавлении дигидрокверцетина. Использовали молоко с содержанием белка, равным $2,9 \pm 0,1\%$. При хранении концентрация белка не изменялась. Для выявления состояния процессов ОМБ в ранние сроки хранения молока в аэробных условиях пробы молока сохранялись при доступе кислорода и температуре 3–4 °С.

С целью ингибирования свободнорадикальных процессов в часть проб молока добавляли дигидрокверцетин в дозе 0,25 мг/л. Уровень карбонильных производных определяли по методу Levine в соответствии с методическими указаниями Е.Е. Дубининой с соавт. [11]. Образование дериватов карбонильных производных аминокислот определяли по их реакции с 2,4-динитрофенилгидразином с регистрацией продуктов их превращения – динитрофенилгидразонов, на спектрофотометре UNICO 2800 при различных длинах волн: от 230 до 535 нм.

Для выявления альдегид-динитрофенилгидразонов (АДНФГ) фиксировали оптическую плот-

ность в ультрафиолетовой части спектра при длинах волн 230, 254, 270, 280, 356 нм, а для выявления кетон-динитрофенилгидразонов (КДНФГ) – при 363 и 370 нм и в области видимого света: для АДНФГ – при 428 и 430 нм, для КДНФГ – при 434, 524, 530, 535 нм. Интенсивность окислительной модификации белков молока оценивали по площади под кривой спектра поглощения динитрофенилгидразонов [11]. Значения площади под кривой выражали в условных единицах на миллилитр (у.е/мл) молока.

Образование карбонильных производных оценивали при спонтанной и металлкатализируемой окислительной модификации белков молока, которую индуцировали добавлением в инкубационную среду 4×10^{-3} М FeSO₄, 1×10^{-3} М ЭДТА, 3×10^{-4} М H₂O₂, приготовленных *ex tempore*. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0. Различия между значениями показателей в сравниваемых группах оценивали с помощью параметрического критерия Стьюдента (*t*), так как результаты соответствовали нормальному распределению и представлены в виде средней арифметической и ошибки средней арифметической ($M \pm m$). Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принимали $p=0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Комплексная оценка содержания продуктов ОМБ позволяет выявить соотношения альдегид-динитрофенилгидразонов и кетон-динитрофенилгидразонов основного (АДНФГо, КДНФГо) и нейтрального (АДНФГн, КДНФГн) характера, а также сопоставить первичные и вторичные маркеры окислительной деструкции белков [10, 12].

Результаты исследования уровня спонтанного образования карбонильных производных белков при хранении молока в аэробных условиях при 3–4 °С свидетельствуют, что накопление модифицированных белков существенно не изменяется через 48 ч (табл. 1). Одинаковый уровень интенсивности ОМБ отмечается и при добавлении в продукт антиоксиданта – дигидрохверцетина.

Иная картина наблюдается при индукции свободнорадикальных процессов по реакции Фентона добавлением ионов железа и пероксида водорода. Общее содержание всех продуктов окислительного карбонилирования белков ($S_{\text{общ}}$) увеличивается на 53% ($p=0,003$) как за счет производных альдегидов, так и кетонов – АДНФГ и КДНФГ.

В молоке, подвергнутому хранению в аэробных условиях при температуре 3–4 °С, индукция окислительных процессов железом приводит к образованию карбонильных производных аминокислот нейтрального и основного характера (табл. 2).

Таблица 1. Показатели спонтанной окислительной модификации белков ($M \pm m$)

Показатель	До инкубации	Через 48 ч инкубации	Через 48 ч + дигидрохверцетин
$S_{\text{общ}}$, у.е/мл молока	212,9±2,8	229,3±22,1 $p=0,48$	221,9±12,4 $p=0,49$ $p_1=0,78$
$S_{\text{АДНФГн}}$, у.е/мл молока	13,2±0,35	14,6±1,01 $p=0,22$	14,5 ±0,57 $p=0,08$ $p_1=0,95$
$S_{\text{АДНФГо}}$, у.е/мл молока	86,6±1,5	91,8±10,1 $p=0,62$	87,9±5,6 $p=0,83$ $p_1=0,74$
$S_{\text{КДНФГн}}$, у.е/мл молока	98,4±1,8	107,5±9,2 $p=0,35$	104,9 ±5,0 $p=0,25$ $p_1=0,82$
$S_{\text{КДНФГо}}$, у.е/мл молока	14,7±0,42	15,4±1,9 $p=0,72$	14,5±1,1 $p=0,91$ $p_1=0,71$
АДНФГ, %	46,5±0,34	46,7±0,45 $p=0,30$	46,5±0,35 $p=0,12$ $p_1=0,60$
КДНФГ, %	53,5±0,34	53,3±0,46 $p=0,30$	53,5±0,35 $p=0,12$ $p_1=0,60$

П р и м е ч а н и е : значения *p* – сравнение с показателями ОМБ до инкубации, значения p_1 – сравнение с показателями ОМБ без добавления дигидрохверцетина.

Таблица 2. Показатели индуцируемой окислительной модификации белков ($M \pm m$)

Показатель	До инкубации	Через 48 ч	Через 48 ч + дигидрохверцетин
Sомб, у.е/мл молока	321,0±24,8	490,8±23,9 $p=0,003$	347,8±23,2 $p=0,451$ $p_1=0,002$
S _{АднФГн} , у.е/мл молока	19,8±1,4	27,5±2,2 $p=0,010$	21,8±1,3 $p=0,303$ $p_1=0,044$
S _{АднФГо} , у.е/мл молока	129,8±11,0	202,0±11,0 $p=0,000$	140,1±10,3 $p=0,514$ $p_1=0,002$
S _{КднФГн} , у.е/мл молока	149,7±10,7	226,4±9,6 $p=0,000$	162,1±9,6 $p=0,405$ $p_1=0,000$
S _{КднФГо} , у.е/мл молока	21,8±2,0	34,7±2,4 $p=0,002$	23,8±2,1 $p=0,519$ $p_1=0,007$
S _{АднФГ} , у.е/мл молока	149,5±12,2	229,8±12,6 $p=0,001$	161,8±11,6 $p=0,481$ $p_1=0,003$
S _{КднФГ} , у.е/мл молока	171,5±12,7	261,1±11,5 $p=0,000$	185,9±11,6 $p=0,420$ $p_1=0,000$
РАП _{АднФГ}	31,4±4,8	53,5±4,4 $p=0,007$	35,3±5,4 $p=0,600$ $p_1=0,026$
РАП _{КднФГ}	32,5±4,4	53,0±3,2 $p=0,004$	34,7±4,5 $p=0,800$ $p_1=0,008$

П р и м е ч а н и е : значения p – сравнение с показателями ОМБ до инкубации. значения p_1 – сравнение с показателями ОМБ без добавления дигидрохверцетина.

Так как существенное повышение уровня карбонильных производных наблюдается только при металлкатализируемой модификации белков и отсутствуют изменения без индукции железом, то проведён подсчет коэффициента показателей доли базального уровня окисления в металлзависимой модификации белков – резервно-адаптационный потенциал (РАП) [10, 12]. Этот коэффициент значительно увеличивается через 48 ч хранения продукта при свободном доступе кислорода и температуре 3–4 °С при определении соотношения (РАП) как для альдегид- (РАП_{АднФГ}), так и для кетон-динитрофенилгидразонов (РАП_{КднФГ}).

Существенное превышение доли металлкатализируемой трансформации белков может указывать на увеличение процессов в области металлсвязывающей поверхности белка. Накопление свободных радикалов за счет металл-индуцируемой реакции происходит на ограниченном участке, вызывая окислительную модификацию близлежащих аминокислотных остатков. В большей степени такой трансформации подвер-

гаются ароматические аминокислоты, а также метионин, цистеин, аргинин, лизин и гистидин [10].

Повышение уровня альдегидных производных свидетельствует о ранних признаках, а увеличение кетонов характеризует поздний этап модификации белка. Отсутствие существенных различий в содержании альдегидных и кетонных производных как при спонтанной, так и при индуцированной модификации белков может указывать на одинаковую интенсивность процессов фрагментации и агрегации.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о накоплении в молоке карбонильных производных аминокислот при хранении продукта в условиях доступа кислорода при 3–4 °С в течение 48 ч.

Присутствие в молоке дигидрохверцетина тормозит образование модифицированных белков. Определение карбонильных производных белков может служить маркером для оценки качественного состава белков молока и для выявления сроков и условий хранения молочных продуктов.

ВЫВОДЫ

При хранении молока в аэробных условиях и температуре 3–4 °С через 48 ч наблюдается активация железо-катализируемой окислительной модификации белков. Показано, что интенсивность спонтанной окислительной модификации белков существенно не изменяется при хранении молока в течение 48 ч. Выявлено, что дигидрокверцетин в дозе 0,25 мг/л тормозит активацию металл-катализируемой модификации белков молока через 48 ч хранения молока в аэробных условиях при температуре 3–4 °С.

Показатели уровня карбонильных производных белков молока могут служить дополнительным маркером для оценки биологической ценности и сроков хранения молока.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дугина Т.А., Калмыкова О.В., Калмыкова Е.В. Перспективы успешного развития садоводства на основе использования инноваций. Концепт. 2015; 21: 1–5.
2. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. Новосибирск, 2008; 284 с.
3. Загоруля И. П., Высокогорский В.Е., Лазарева О.Н, Игнатьева Г.В. Окислительная модификация белков молока при пастеризации. Молочная промышленность. 2019; 7: 8–9.
4. Балакирева Ю.В., Зайцев С.Ю., Каримова Ф.Г., Акулов А.Н., Ахмадулина Ф.Ю. Влияние режима пастеризации на полипептидный состав молока. Фундаментальные исследования. 2012; 2: 170–173.
5. Игнатьева Г.В. Высокогорский В.Е. Характеристика антиокислительных свойств микрофильтрованного молока. Молочная промышленность. 2012; 12: 53–54.
6. Щербачева Ю.В., Акулов А.Н., Ахмадулина Ф.Ю., Каримова Ф.Г. Электрофоретические исследования влияния тепловой обработки на полипептидный состав коровьего молока. Фундаментальные исследования. 2015; 2: 3544–3548.
7. Barrefors P., Granelli K., Appelqvist L.-A., Bjorck L. Chemical characterization of raw milk samples with and without oxidative off-flavour. Journal of Dairy Science. 1995; 78: 2691–2699.
8. Calligaris S., Manzocco L., Anese M., Nicoli M.C. Effect of heat-treatment on the antioxidant and pro-oxidant activity of milk. International Dairy Journal. 2004; 14: 421–427.
9. Smet K., Raes K., De Block J., Herman L., Dewettinck K., Coudijzer K. A change in antioxidative capacity as a measure of onset to oxidation in pasteurized milk. Int. DairyJ. 2008; 5: 520–530.
10. Фомина М.А., Абаленихина Ю.В. Окислительная модификация белков тканей при изменении синтеза оксида азота. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2018; 192 с.
11. Дубинина Е.Е. Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения. Вопросы медицинской химии. 1995; 41(1): 24–26.
12. Патент № 2524667 (РФ). Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях / М.А. Фомина и др.; Ряз. гос. мед. ун-т им. И.П. Павлова. опубли. 27.07.2014, Бюл. № 21. 8 с.

Поступила после доработки 9 августа 2021 г.

INTENSITY OF INDUCED CARBONYLATION OF MILK PROTEINS AS AN IDENTIFIER OF THEIR PRESERVATION

© Authors, 2021

G.G. Kryshkina

Post-graduate Student, Omsk State Agrarian University (Omsk, Russia)

E-mail gg.kryshkina@omgau.org

V.E. Vysokogorskiy

Dr.Sc. (Med.), Professor, Omsk State Agrarian University (Omsk, Russia)

M.A. Sokolova

Post-graduate Student, Omsk State Agrarian University (Omsk, Russia)

N.V. Strelchik

Ph.D. (Veterinary), Associate Professor, Omsk State Agrarian University (Omsk, Russia)

Relevance. Preservation of anti-oxidative protection of milk is important for preservation of biological properties and taste of the product. The most sensitive marker of activation of free radical processes is oxidative modification of proteins, which served as the basis for determining its level during milk storage.

The purpose of the study. Determine the intensity of spontaneous and metal-catalyzed oxidative modification of proteins in the early shelf life of milk.

Material and methods. The material of the study was samples of drinking pasteurized milk. To identify the state of oxidative modification of proteins in the early shelf life, milk samples were stored at oxygen access and a temperature of 3–4 °С. In some samples of milk, dihydroquercetin was added at a dose of 0.25 mg/L. The formation of derivatives of carbonyl amino acid derivatives was determined by their reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine with the registration of dinitrophenylhydrazones on the UNICO 2800 spectrophotometer with various wavelengths from 230 to 535 nm.

Results. When determining the spontaneous oxidative modification of proteins after 48 hours of milk storage under aerobic conditions, no significant accumulation of carbonyl protein derivatives was detected. In the induction of free radical processes by the addition of iron ions and hydrogen peroxide, the total content of all products of oxidative carbonylation of proteins increases after 48 hours of storage of milk under aerobic conditions by 53%, both due to aldehyde derivatives and ketones. Induction of oxidative processes by iron leads to the formation of carbonyl derivatives of amino acids of a neutral and basic nature. After 48 hours of milk storage, the reserve-adaptation potential for both aldehydes and ketone-dinitrophenylhydrazones increases. Dihydroquercetin at a dose of 0.25 mg/l inhibits the activation of metal-catalyzed modification of milk proteins after 48 hours of milk storage under aerobic conditions at a temperature of 3–4 °C.

Conclusion. Indicators of the level of carbonyl derivatives of milk proteins can serve as an additional marker for assessing the biological value and shelf life of milk.

Key words: oxidative modification of proteins, oxidative stress, milk, dihydroquercetin, aldehyde-dinitrophenylhydrazones, ketone-dinitrophenylhydrazones.

For citation: Kryshkina G.G., Vysokogorskiy V.E., Sokolova M.A., Strelchik N.V. Intensity of induced carbonylation of milk proteins as an identifier of their preservation. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2021;24(11):9-14. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-11-02>

REFERENCES

1. Dugina T.A., Kalmykova O.V., Kalmykova E.V. Perspektivy uspehnogo razvitiya sadovodstva na osnove ispol'zovanija innovacij. *Koncept*. 2015; 21: 1–5.
2. Men'shchikova E.B., Zenkov N.K., Lankin V.Z. Okislitel'nyj stress: Patologicheskie sostojanija i zabelevanija. Novosibirsk, 2008; 284 s.
3. Zagorulja I. P., Vysokogorskiy V.E., Lazareva O.N., Ignat'eva G.V. Okislitel'naja modifikacija belkov moloka pri pasterizacii. *Molochnaja promyshlennost'*. 2019; 7: 8–9.
4. Balakireva Ju.V., Zajcev S.Ju., Karimova F.G., Akulov A.N., Ahmadullina F.Ju. Vlijanie rezhima pasterizacii na polipeptidnyj sostav moloka. *Fundamental'nye issledovanija*. 2012; 2: 170–173.
5. Ignat'eva G.V. Vysokogorskiy V.E. Harakteristika antiokislitel'nyh svojstv mikrofil'trovannogo moloka. *Molochnaja promyshlennost'*. 2012; 12: 53–54.
6. Shherbakova Ju.V., Akulov A.N., Ahmadullina F.Ju., Karimova F.G. Jelektroforeticheskie issledovanija vlijanija teplovoj obrabotki na polipeptidnyj sostav korov'ego moloka. *Fundamental'nye issledovanija*. 2015; 2: 3544–3548.
7. Barrefors P., Granelli K., Appelqvist L.-A., Bjorck L. Chemical characterization of raw milk samples with and without oxidative off-flavour. *Journal of Dairy Science*. 1995; 78: 2691–2699.
8. Calligaris S., Manzocco L., Anese M., Nicoli M.C. Effect of heat-treatment on the antioxidant and pro-oxidant activity of milk. *International Dairy Journal*. 2004; 14: 421–427.
9. Smet K., Raes K., De Block J., Herman L., Dewettinck K., Coudijzer K. A change in antioxidative capacity as a measure of onset to oxidation in pasteurized milk. *Int. Dairy J.* 2008; 5: 520–530.
10. Fomina M.A., Abalenihina Ju.V. Okislitel'naja modifikacija belkov tkanej pri izmenenii sinteza oksida azota. M.: GJeOTAR-Media. 2018; 192 s.
11. Dubinina E.E. Burmistrov S.O., Hodov D.A., Porotov I.G. Okislitel'naja modifikacija belkov syvorotki krovei cheloveka, metod ee opredelenija. *Voprosy medicinskoj himii*. 1995; 41(1): 24–26.
12. Patent № 2524667 (RF). Sposob kompleksnoj ocenki sodержanija produktov okislitel'noj modifikacii belkov v tkanjah i biologicheskikh zhidkostjah / M.A. Fomina i dr.; Rjaz. gos. med. un-t im. I.P. Pavlova. opubl. 27.07.2014, Bjul. № 21. 8 s.