
Е.В. Зуховицкая¹, В.А. Снежицкий¹, Е.М. Дорошенко¹, В.М. Пырочкин¹,
М.С. Дешко¹, Т.П. Стемпень², А.В. Наумов¹,
¹Гродненский государственный медицинский университет,
²Гродненский областной кардиологический диспансер

Анализ выживаемости больных с хронической сердечной недостаточностью

Поступила в редакцию 27.12.2009 г.

Резюме

Проблема хронической сердечной недостаточности (ХСН) связана с высокой распространенностью и смертностью больных, несмотря на успехи в лечении. Из числа биомаркеров, позволяющих прогнозировать риск неблагоприятных событий у больных ХСН, не достаточно изучены ассоциации с уровнем гомоцистеина (Hcy), мелатонина (Mel) и триптофана (Trp).

Целью исследования явилось определение прогностического значения биогенных аминов в оценке риска смерти больных с ХСН.

Проведено исследование выживаемости 120 больных с 2-4 ФК (средний возраст 56 ± 13 лет, 95 муж. 25 жен.): 27 больных идиопатической ДКМП, 43 больных ишемической кардиомиопатией (ИКМП), 50 больных ИБС с (Н I-IIб). Наблюдение продолжалось в среднем 18 месяцев (от 0,01 года до 3 лет). У всех больных выполнялся забор крови с последующей оценкой Hcy, Mel и Trp с помощью ион-парной ВЭЖХ с детектированием по флуоресценции.

За период наблюдения в группе ДКМП умерло 32% (9 из 27), в группе ИКМП – 19% (8 из 43), в группе ИБС – 8% (4 из 50). У умерших больных по сравнению с выжившими уровень триптофана и мелатонина определялся достоверно ниже ($9,7 \pm 7,5$ и $26,3 \pm 22,5$ мкмоль/л; $p=0,014$ и $0,004 \pm 0,0014$ и $0,006 \pm 0,0040$ пг/мл; $p=0,010$). Кривые выживаемости больных ХСН (Kaplan-Meier method and log-rank test) значительно отличались у пациентов со значениями Trp выше и ниже $9,25$ мкмоль/л и Mel выше и ниже $0,0032$ пг/мл, даже после корректировки по возрасту, ФК ХСН, фракции выброса, развитию жизнеопасных желудочковых аритмий, общего уровня Hcy и снижение вариабельности сердечного ритма.

Таким образом, более низкий уровень триптофана и мелатонина оказались независимо ассоциированными с наиболее неблагоприятным прогнозом.

■ ВВЕДЕНИЕ

Глобальный характер проблемы хронической сердечной недостаточности (ХСН) обусловлен его высокой распространенностью и смертностью больных, у которых этот синдром развился, поэтому анализ факторов, способных влиять на выживаемость больных с ХСН, является

актуальным, поскольку необходимо совершенствование методов стратификации риска на базе определения прогностических параметров [1]. До настоящего времени проблема эффективного выявления больных с высоким риском неблагоприятного исхода не решена, несмотря на большое количество способов оценки риска. Предсказательная ценность их положительного результата остается недостаточно высокой и редко достигает 40% [2].

Среди всего многообразия используемых в медицинской науке и практике биомаркеров, позволяющих прогнозировать риск неблагоприятных событий у больных ХСН, мы сосредоточили внимание на трех из них: натрийуретический пептид типа В, или мозговой натрийуретический пептид (BNP) [3, 4], гомоцистеин (Hcy)[5, 6], мелатонин (Mel) [7] и триптофан (Trp) [8].

Целью представленного исследования было сопоставление результатов длительного наблюдения больных с клинически манифестированной ХСН, с уровнями сердечно-сосудистых биомаркеров: натрийуретического пептида типа В, гомоцистеина и триптофана в плазме крови и мелатонина в тромбоцитах, а также с другими клинико-функциональными характеристиками состояния больных.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено ретроспективное исследование выживаемости 120 больных с ХСН 2-4 ФК по классификации Нью-Йоркской ассоциации сердца (NYHA), наблюдавшихся на базе УЗ «Гродненский областной кардиологический диспансер». Когорта больных была разделена на группы на основании нозологического критерия и стадии ХСН: 1-ю группу составили 27 больных дилатационной кардиомиопатией (ДКМП) (средний возраст – 43,5±8,9), 2-я группа была сформирована из 43 больных ишемической кардиомиопатией (ИКМП) (средний возраст – 60,2±10,3), 3-я группа была образована из 50 больных ИБС с различной выраженностью сердечной недостаточности (Н I-IIб) (средний возраст – 61,3±10,5). В группу сравнения включили 10 пациентов с ИБС без признаков наличия ХСН.

При обследовании перед включением в настоящее исследование регистрировали клиническое состояние пациентов, эхокардиографические (ЭХО-КГ) параметры систолической функции ЛЖ, показатели вариабельность сердечного ритма (BCP), холтеровское мониторирование ЭКГ.

У всех больных выполнялся забор крови и ее немедленное центрифугирование для получения плазмы и тромбоцитов. Тромбоциты осаждали центрифугированием из 1,0 мл обогащенной тромбоцитами плазмы, концентрацию мелатонина определяли в пг на мл осадка [9]. Образцы замораживали и хранили до проведения исследований при -80 С°. Мелатонин определяли с помощью HPLC с флуоресцентной детекцией [10].

Таблица 1
Распределение в группах по по ФК (NYHA)

Группа		Группа сравнения	1 (n=27)	2 (n=43)	3 (n=50)
Стадия ХСН	нет	100%	0	0	0
	1	0	0	4,1%	42,6%
	2а	0	25,9%	36,7%	53,4%
	2б	0	70,4%	57,2%	4,0%
	3	0	3,7%	2,0%	0

Определение уровня BNP в плазме крови проводилось с помощью тест-полосок на портативном приборе (Triage Meter Plus, Biosite Diagnostics, USA). Измерение построено по принципу иммунофлуоресцентного анализа.

Для определения Hсу в плазме крови использовали высокоэффективный жидкостной хроматограф (HPLC Agilent 1100, HP), содержащий 4-канальный градиентный насос, термостат колонок, автосамплер и детектор флуоресценции. Регистрация хроматограмм и их количественная обработка осуществлялись с помощью Agilent ChemStation A10.01 [10].

Определение триптофана в плазме крови проводили с помощью ион-парной ВЭЖХ с детектированием по флуоресценции [10].

Наблюдение продолжалось в среднем 1,5 года (от 0,01 года до 3 лет). Для ретроспективной оценки выживаемости состояние больных определяли методом опроса больных или их родственников по телефону. Региструемые событиями были случаи смерти.

Анализировали выживаемость с помощью программы STATISTICA 6.0. При определении показателя выживания использовали его оценку по методу Каплана–Мейера [11]. Для сравнения этих показателей применяли F-критерий Кокса. Для определения изучаемых параметров на выживаемость использовался регрессионный метод Кокса.

Результаты представлены как среднее и его стандартное отклонение ($M \pm SD$) и 25-й и 75-й перцентили для количественных величин, а

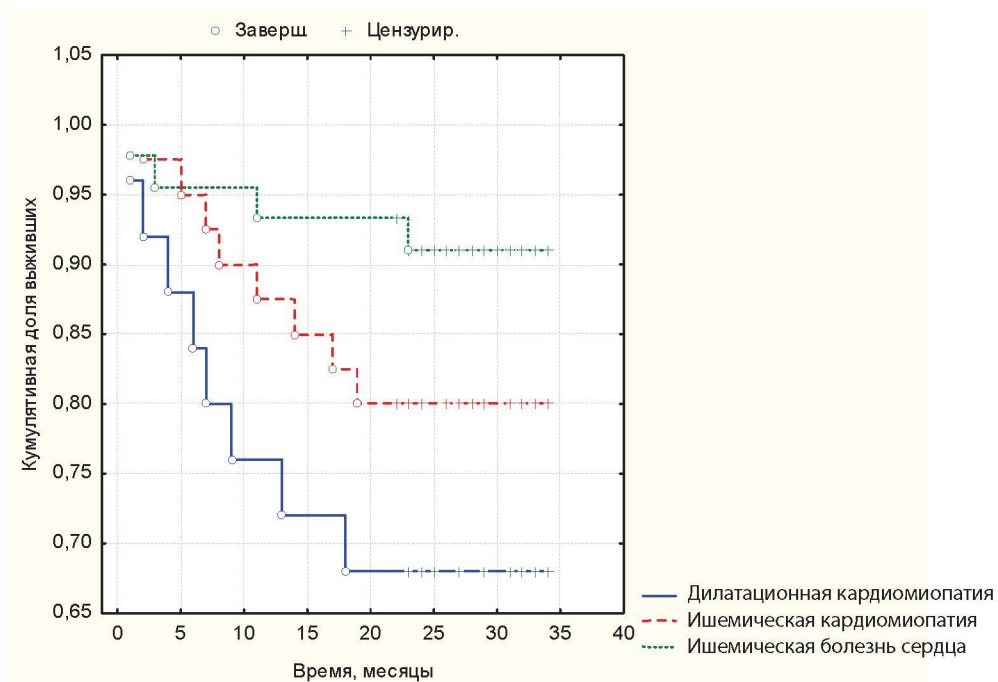


Рисунок 1
Кумулятивные кривые выживаемости (по методу Каплана–Мейера) больных с ХСН за 3-летний период

также как процент от общего числа больных для категориальных переменных. С учетом выявленных значений отобранных переменных построены кривые времени наступления неблагоприятного исхода (кривые Каплана–Мейера). Статистически значимыми считали различия при значениях двухстороннего теста Фишера $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

За период наблюдения в группе ДКМП умерло 32% (9 из 27), в группе ИКМП – 19% (8 из 43), в группе ИБС – 8% (4 из 50). У больных ХСН смертность за период наблюдения составила 17,5% (21 из 120), или за год в среднем 5,8%. Кумулятивное соотношение выживаемости пациентов с клинически манифестированной ХСН прогрессивно ухудшалось, и доля выживших составила 82,5% на момент завершения исследования. На рис. 1 приведены кривые выживаемости больных ХСН для каждой из групп в отдельности в течение 3 лет.

Как показано на рис. 1, анализ 3-летнего периода выживания по методу Каплана–Мейера у больных с ХСН обнаружил существенное различие в его величинах, кривые разошлись практически сразу после начала наблюдения и продолжали расходиться в течении первых 20 месяцев, и в последующем они были параллельными. К 12 месяцу суммарная доля выживания больных группы ДКМП составила 0,74 по сравнению с 0,87 у больных группы ИКМП и 0,94 в группе ИБС и к 20 месяцу она была соответственно 0,68 и 0,81 и 0,91, к концу периода наблюдения она практически не изменилась. Различия кривых выживаемости в сравниваемых группах оказалась достоверной ($p < 0,05$). Таким образом, выживаемость оказалась значимо ниже у больных ДКМП, чем у пациентов ИКМП и ИБС.

Таблица 2
Показатели, влияющие на смертность больных с хронической сердечной недостаточностью

	Умершие		Выжившие		P
	M	STD	M	STD	
Возраст	49,400	13,1605	57,451	12,0187	0,016397
АД	128	19	138	21	0,022364
ЧСС	79	15	70	12	0,032490
Триптофан	9,720	7,5381	26,273	22,5026	0,014779
Мелатонин	0,004	0,0014	0,006	0,0040	0,010250
ФВ ЛЖ	34,600	10,8405	44,129	12,4037	0,000992
КСО	152,200	53,0666	109,835	52,6682	0,001433
КДО	231,050	51,4827	188,297	57,2644	0,001700
КДД	67,750	8,3784	61,901	8,1922	0,009100
КСД	54,700	8,7965	48,187	9,9943	0,004824
ЛП	48,400	7,0963	43,835	5,9801	0,005203
VLF%	75,346	25,7450	61,750	18,1127	0,046592
Q-Td	162,833	45,8930	110,120	77,7680	0,035476
BNP	676,727	583,2596	384,405	357,2448	0,025769

Проведенный многофакторный статистический анализ исходных данных по влиянию на смертность больных ХСН выявил достоверные различия в показателях из числа изучавшихся у умерших за период наблюдения по сравнению с больными выжившими (табл. 2).

Как видно из табл. 2, у больных, умерших за период наблюдения, по сравнению с больными выжившими, отмечено более низкое систолическое АД (126 ± 19 и 138 ± 21 мм рт.ст; $p=0,022$) и большая ЧСС (79 ± 15 и 70 ± 15 уд/мин; $p=0,032$).

У умерших больных при исходном обследовании отмечены более низкая ФВ ЛЖ ($34,6 \pm 10,8$ и $44,1 \pm 12,4$ соответственно, $p=0,0009$) и значимо выше объемно-геометрические показатели левого желудочка и размеры левого предсердия. Следовательно, более существенное снижение показателей выживания больных с ХСН происходит при значительном снижении ФВ и изменениях геометрии камер сердца.

Как видно из данных, представленных на рис. 2, кривые выживаемости пациентов в зависимости от величины ФВ ЛЖ различаются с высокой статистической значимостью.

Выживание больных с ХСН определяется степенью тяжести систолической дисфункции. Оно достоверно меньше у больных с ФВ $<35\%$ по сравнению с больными, у которых этот показатель был выше ($\chi^2=12,7861$, $p=0,0168$).

Из различных показателей ВСР, которые измерялись у больных ХСН, только VLF% показатель, характеризующий относительное значение

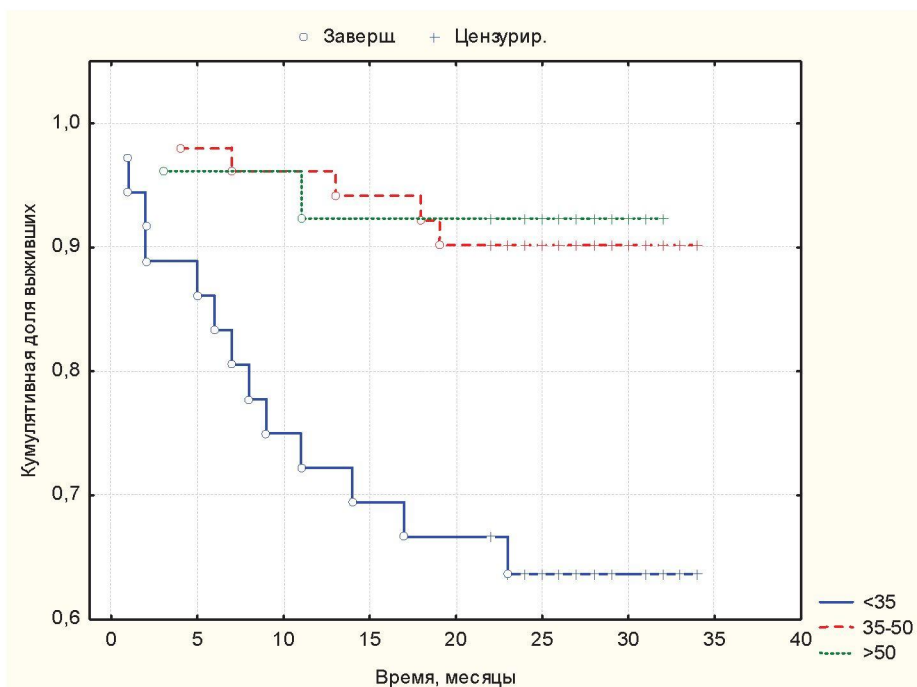


Рисунок 2
Кумулятивные кривые выживаемости больных с ХСН за 3-летний период в зависимости от ФВ ЛЖ

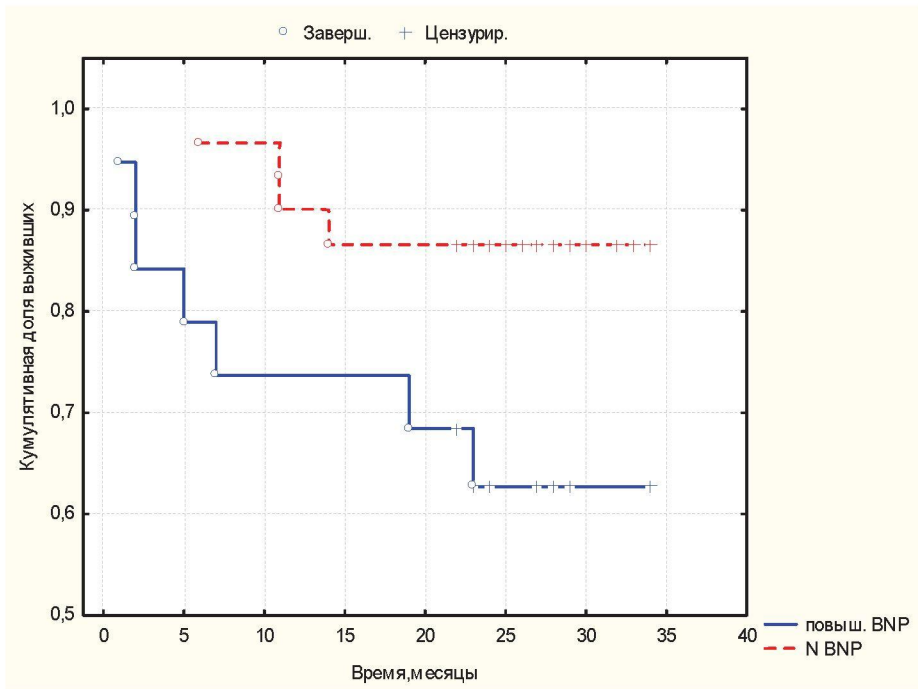


Рисунок 3
Кумулятивные кривые выживаемости больных с ХСН в зависимости от уровня мозгового натрийуретического пептида

волн очень низкой частоты в спектре, достоверно различался у умерших по сравнению с выжившими пациентами. В отношении его значения в оценке вегетативного статуса ведутся дебаты. Большинство исследователей сходятся во мнении, что он отражает активность симпатического отдела, но на более сложном, надсегментарном, уровне регуляции, а значит, и более чувствителен [12]. Также имеются сведения о его взаимосвязи с активностью метаболических процессов в организме, ренин-ангиотензиновой системой, а активность последней отражает степень прогрессирования ХСН [13].

Статистически достоверным оказалось влияние на смертность исходного уровня BNP (а именно, исходный уровень BNP выше 400 пг/мл, $p=0,025$), что, естественно, являлось ожидаемым результатом, кривые выживаемости пациентов в зависимости от уровня BNP выше и ниже 400 пг/мл значительно различались (рис. 3).

Также имелись статистически значимые различия в выживаемости пациентов в зависимости от наличия или отсутствия одного из видов желудочковых аритмий ($p=0,046$), парных и групповых желудочковых экстрасистол (ЖЭС) ($p=0,0001$ и $p=0,032$) и желудочковой тахикардии ($p=0,037$).

То, что существование систолической дисфункции, желудочковых аритмий, повышенного уровня BNP сопряжено с большим числом

Таблица 3

	Триптофан		Мелатонин		Гомоцистеин	
	>25%	<25%	>25%	<25%	<75%	>75%
умершие	31,25%	68,75%	25%	75%	66,67%	33,33%
выжившие	62,8%	37,2%	74,65%	25,35%	65,12%	34,88%
p	0,0431		0,03		>0,05	

смертей больных ХСН понятно, менее ожидаемой оказалась связь с риском смерти пониженного уровня Trp и Mel (табл. 2).

В нашем исследовании более низкий исходный уровень Trp наблюдался у умерших больных по сравнению с выжившими ($9,7 \pm 7,5$ и $26,3 \pm 22,5$ мкмоль/л; $p=0,014$).

Оптимальным для оценки выживаемости разделительным уровнем Trp явилось значение $9,26$ мкмоль/л, соответствующее 25% перцентили, определенной для всей выборки. Относительно этого значения Trp были определены шансы развития желудочковых аритмий у больных ХСН. При этом получено, что шансы возникновения ЖЭС >30 час выше в 3,0 раза, полиморфных ЖЭС – в 2,2 раза выше, а пароксизмальных желудочковых тахикардий – в 4 раза при концентрации триптофана в плазме крови ниже $9,26$ мкмоль/л по сравнению с пациентами, у которых уровень триптофана выше [14].

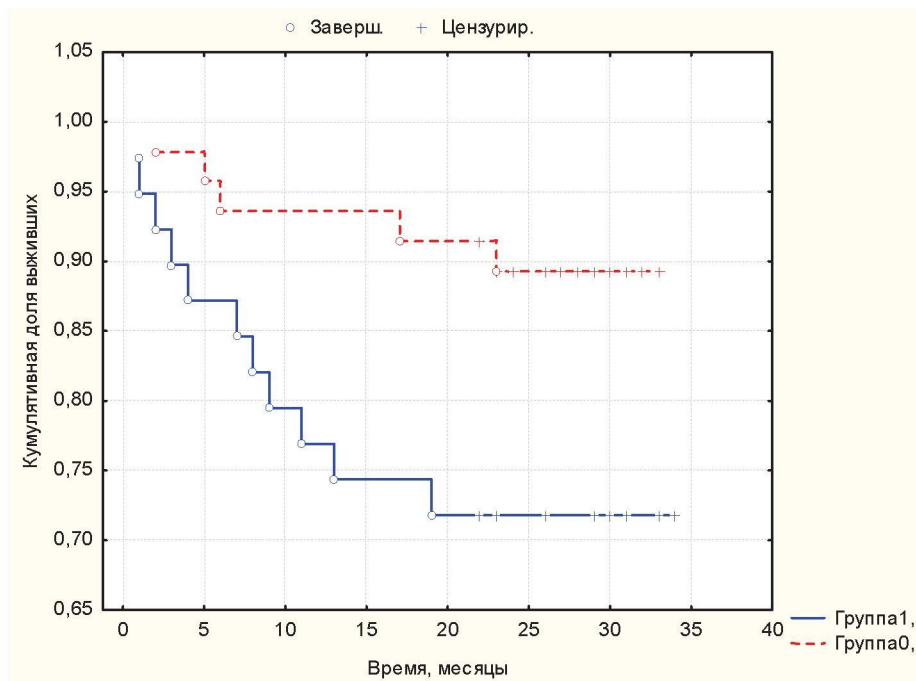


Рисунок 4
Кумулятивные кривые выживаемости больных с ХСН за 3-летний период с исходным уровнем триптофана выше и ниже $9,26$ мкмоль/л

После проведения корреляционного анализа между частотой ЖНР и уровнем Тг_р выявлены умеренные корреляции между значением Тг_р и парными и групповыми ЖЭС ($r=-0,20$ и $r=-0,26$, $p<0,02$), а также ЖЭС >30 час ($r=-0,20$, $p=0,0001$) [14].

С уровнем Тг_р $< 9,26$ мкмоль/л число умерших пациентов было достоверно больше, чем среди больных с уровнем Тг_р выше этого значения, с другой стороны, уровень Тг_р выше 25% перцентиля определялся у 62,8% выживших пациентов по сравнению с 37,2% умерших пациентов ($p<0,05$) (табл. 3).

Кривые выживаемости по методу Каплана-Мейера в группах больных в зависимости от уровня Тг_р выше и ниже 9,26 мкмоль/л представлены на рис. 4.

Анализ выживаемости показал (рис. 4), что полученные кривые значительно отличались у пациентов с уровнем Тг_р выше и ниже значения 9,26 мкмоль/л. Причем кумулятивное соотношение выживаемости пациентов с уровнем Тг_р $<9,26$ мкмоль/л прогрессивно ухудшалось, и к концу 3 года наблюдения составило 0,73 по сравнению с 0,89 у пациентов с уровнем Тг_р $>9,26$ мкмоль/л ($p=0,0154$).

Более низкий исходный уровень Mel наблюдался у умерших больных по сравнению с выжившими ($0,004\pm 0,0014$ и $0,006\pm 0,0040$ мкмоль/л; $p=0,010$).

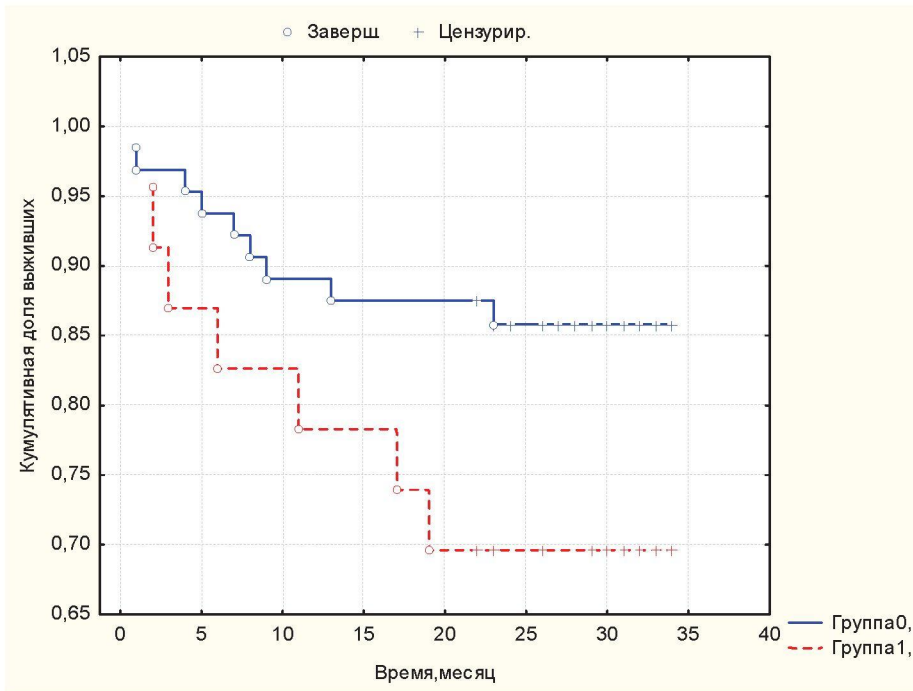


Рисунок 5
Кумулятивные кривые выживаемости больных с ХСН в зависимости от уровня мелатонина выше и ниже 0,0032 пг/мл

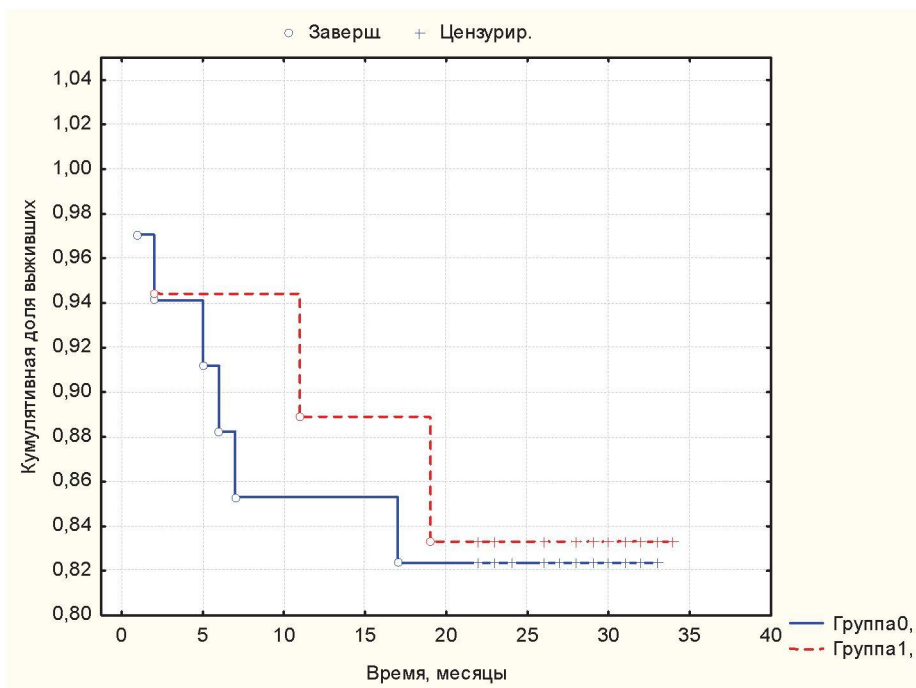


Рисунок 6
Кумулятивные кривые выживаемости больных с ХСН с исходным уровнем гомоцистеина выше и ниже 11,98 мкмоль/л

Наше исследование показало статистически значимые различия в кумулятивной выживаемости пациентов с уровнем MeI выше и ниже 0,0032 пг/мл, который соответствовал 25% перцентили, определенной для всей выборки. Относительно этого значения были определены шансы развития ЖНР у исследуемых больных. Было получено, что при концентрации мелатонина в тромбоцитах 0,0032 пг/мл и ниже этого значения шансы возникновения ЖЭС в 3,0-3,5 раза выше, чем у пациентов с уровнем мелатонина выше [15]. Кроме того, по результатам корреляционного анализа получены следующие взаимосвязи между уровнем MeI и ЖНР: парными ЖЭС ($r=-0,20, p=0,005$); групповыми ЖЭС ($r=-0,21, p=0,0009$); полиморфными ЖЭС ($r=-0,21, p=0,0318$) и одним из ЖНР высоких градаций ($r=-0,26, p=0,03$) [15].

В нашем исследовании у 75% умерших пациентов уровень MeI был ниже 0,0032 пг/мл и у 25% умерших пациентов – MeI >0,0032 пг/мл. В то время как 74,65% выживших больных имели уровень MeI >0,0032 пг/мл ($p=0,03$) (табл. 3).

На рис. 5 показаны кумулятивные кривые выживаемости больных с ХСН в зависимости от уровня мелатонина.

Как видно из рис. 5, выживаемость больных с уровнем MeI <0,0032 пг/мл отличалась от таковой у больных с уровнем MeI выше этого значе-

ния ($p=0,03$). Кроме того, кривые кумулятивной выживаемости пациентов и в случае с триптофаном и в случае с мелатонином до настоящего времени не пересекаются друг с другом.

Таким образом, более низкие исходные уровни триптофана и мелатонина, так же как и уровень натрийуретического пептида более 400 пг/мл, связаны с большим числом случаев смерти у больных ХСН.

В нашем исследовании кривая выживаемости пациентов с уровнем Hcy > 11,98 мкмоль/л (значение, соответствующее 75% перцентили, определено для всей выборки) приближалась к кривой выживаемости пациентов с уровнем Hcy < 11,98 мкмоль/л (рис. 6).

Таким образом, выживаемость больных с уровнем Hcy > 11,98 мкмоль/л не отличалась от таковой у больных с уровнем Hcy < 11,98 мкмоль/л.

Однако включения в анализ выживаемости факта низкой ФВ ЛЖ, возраста, стадии ХСН, повышенного уровня BNP – известных предикторов смертности у больных ХСН – не изменило общего результата, и низкий уровень триптофана и мелатонина по-прежнему влиял на выживаемость больных ХСН.

Более низкий уровень триптофана и мелатонина оказался независимо ассоциированными с наиболее неблагоприятным прогнозом.

■ ВЫВОД

У больных с ХСН выживаемость зависит от ряда показателей, характеризующих функциональное состояние сердечно-сосудистой системы, а также от уровней триптофана, мелатонина и BNP.

Resume

Zukhovitskaya E.V.¹, Snezhitskiy V.A.¹, Doroshenko E.M.¹, Pyrochkin V.M.¹, Deshko M.S.¹, Stempen T.P.², Naumov A.V.¹,

¹Grodno State Medical University, Belarus,

²Grodno Regional Cardiology Clinic, Belarus

Analysis of survival rates in patients with congestive heart failure: results of multivariate analysis

Heart failure and is a major cause of morbidity as it is the end stage of all diseases of the heart, mortality as it is lethal condition. There is an increasing interest in the development of new biomarkers. We focused on some biogenic amines as homocystein (Hcy), melatonin (Mel), tryptophan (Trp) that were known to have impact on the development and progression of cardiovascular pathology but less was known about their role in heart failure.

The purpose of research was to evaluate prognostic value of biomines in predicting mortality of patients with congestive heart failure.

120 patients (aged 56+/-13 years, 95 males, 25 females) with congestive heart failure - NYHA I (n=17), II (n=52), III (n=46), IV (n=5) - resulted from idiopathic dilated cardiomyopathy (n=27), ischemic cardiomyopathy (n=43), coronary heart disease (n=50) were examined. Blood sampling was performed with subsequent evaluation of Hcy and bioamines TRP, MEL by high performance ion-pair liquid chromatography with fluorescence detection. Follow-up of the patients lasted for 1 month – 3 years (median 18 months).

21 patients (9 (32.3%) and 8 (19%) patients with dilated and ischemic cardiomyopathy respectively and 4 (8.0%) with coronary heart disease) died for various cardiovascular causes during aforementioned period. Survived patients were found to have significantly higher baseline values of TRP ($9,7 \pm 7,5$ vs. $26,3 \pm 22,5$ mcmol/L, $p=0.014$) and MEL ($0,004 \pm 0,0014$ vs. $0,006 \pm 0,0040$ pg/mL, $p=0.01$). Significant difference in event-free survival duration was found using Kaplan-Meier method and log-rank test according to values of TRP $9,26$ mcmol/L ($p=0.002$), MEL 0.0032 pg/mL ($p=0.005$). In multivariate analysis after adjustment for age, gender, and established risk factors of poor prognosis in heart failure (NYHA functional class, ejection fraction, development of life-threatening arrhythmias, total plasma homocystein, low heart rate variability) TRP and Mel remained significant (hazard ratio 12.2, 95% confidence interval 2.1-70.7, $p=0.005$).

Thus, tryptophan and melatonin have impact on cardiovascular mortality of patients with congestive heart failure.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Беленков, Ю.Н. Хроническая сердечная недостаточность. Избранные лекции по кардиологии / Ю.Н. Беленков, В.Ю. Мареев, Ф.Т. Агеев; под ред. Ю.Н. Беленкова. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2006. – 432 с.
2. Bigger, J.T. Identification of patients at high risk for sudden cardiac death / J.T. Bigger // *Am.J.Cardiol.* – 1984. – Vol. 54, № 14. – P. 3D-8D.
3. Андреев Д.А., Рыкова М.С. Натрийуретические белки В-типа при сердечной недостаточности // *Клин. Медицина.* – 2004. – Т. 82, № 6. – С. 4-8.
4. Berger R., Huelsman M., Strecker K. et al. B-Type Natriuretic Peptide Predicts Sudden Death in Patients With Chronic Heart Failure // *Circulation.* – 2002. – Vol. 105. – P. 2392-2397.
5. Наумов А.В. Роль нарушений процессов метилирования и обмена метионина в патогенезе заболеваний человека. // *Журнал ГрГМУ.* – 2007. – №1. – С. 4-7.
6. Парамонов А.Д., Моисеев С.В., Фомин В.В. и др. Гипергомоцистеинемия и белки острой фазы при различных формах ишемической болезни сердца // *Тер. Архив.* – 2004. – Т. 76, № 6. – С. 67-70.
7. Altun A., Ugur-Altun B. Melatonin: therapeutic and clinical utilization // *Int. J. Clin. Pract.* – 2007. – Vol. 61, № 5. – P. 835-845.
8. Immune activation and degradation of tryptophan in coronary heart disease / B. Wirleitner [et al.] // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2003. – Vol. 33, № 7. – P. 550-554.
9. Савошинский Е.М., Наумов А.В. Тромбоциты как новый диагностический фактор // В кн.: *Актуальные вопросы современной медицины. // Материалы 57-й итоговой научной конференции студентов и молодых учёных ВГМУ 21-22 апреля 2005 года. Тезисы докладов.* Витебск, 2005. С. 99-100.

10. Золотухин, М.М. Метод определения метаболитов гидроксилазного пути обмена триптофана в эпифизе крысы с помощью ион-парной хроматографии с детектированием по флуоресценции / М.М. Золотухин, Е.М. Дорошенко // Журнал ГГМУ. – 2007. – № 2. – С. 25.
11. Кокс Д.Р., Оукс Д. Анализ данных типа времени жизни. – М.: Финансы и статистика, 1998. – С. 19-52.
12. Михайлов, В.М. Вариабельность сердечного ритма: опыт практического применения метода / В.М. Михайлов. – Иваново: Ивановская гос. мед. академия, 2002. – 290 с.
13. Голухова, Е.З. Неинвазивная аритмология / Е.З. Голухова. – Москва: Изд. НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, 2002. – 148 с.
14. Зуховицкая Е.В. Желудочковые нарушения ритма: связь с уровнем триптофана. // Кардиология в Беларуси, 2009. – № 2.– С.25-28.
15. Зуховицкая Е.В. Значения некоторых биомаркеров при хронической сердечной недостаточности, обусловленной идиопатической дилатационной и ишемической кардиомиопатией. /Е.В. Зуховицкая, В.А. Снежицкий, В.М. Пырочкин, А.В. Наумов, Е.М. Дорошенко, Т.Н. Степень// Здоровоохранение. – 2009. – № 7. – С. 12-15.