

Уровень ингибина А в сыворотке крови женщин, страдающих хроническим трихомонозом, как предиктор развития бесплодия

Наталья Игоревна Гудинская¹, Оксана Витальевна Бойко^{1*},
Наталья Александровна Грибова², Рушания Ибрагимовна Мухамедзянова¹

¹Астраханский государственный медицинский университет, г. Астрахань, Россия;

²Клинический родильный дом, г. Астрахань, Россия

Реферат

Цель. Определить взаимосвязь уровня ингибина А и биохимических факторов воспаления с развитием бесплодия у женщин, страдающих хроническим трихомонозом.

Методы. Объектом исследования служила сыворотка крови 167 женщин, страдающих хроническим трихомонозом. Уровень ингибина А определяли методом иммуноферментного анализа. В качестве контроля использована сыворотка крови 22 практически здоровых фертильных женщин, не имевших в анамнезе трихомоноза. Определение фенотипа лимфоцитов осуществляли с помощью люминесцентного микроскопа, проводя окрашивание моноклональными антителами. Уровень иммуноглобулинов в сыворотке крови определяли стандартным методом радиальной иммунодиффузии по Манчини. Синтез цитокинов определяли способом исследования спонтанного синтеза интерлейкинов-1 β , -8, -10 и интерферона γ . Уровень цитокинов и лактоферрина оценивали иммуноферментным методом. Концентрации α_2 -макроглобулина и С-реактивного белка определяли нефелометрическим методом. Концентрацию фибриногена определяли коагулометрическим методом.

Результаты. В группе больных хроническим трихомонозом обнаружена существенная вариабельность сывороточной концентрации ингибина А от 4,3 до 29,4 нг/л. В группе больных, имевших сниженное содержание ингибина А, в 63,2% случаев в последующем диагностировано развитие вторичного бесплодия; в группе больных, имевших нормальный уровень ингибина А, вторичное бесплодие развилось только в 12,9% случаев.

Вывод. Установлено, что из всех белков острой фазы только уровни С-реактивного белка и лактоферрина имеют прогностическое значение и статистически значимо различаются в группах женщин с развившимся впоследствии бесплодием и не осложнённым бесплодием трихомонозом.

Ключевые слова: ингибин А, С-реактивный белок, интерлейкины, фибриноген, α_2 -макроглобулин, лактоферрин, трихомоноз, бесплодие.

Для цитирования: Гудинская Н.И., Бойко О.В., Грибова Н.А., Мухамедзянова Р.И. Уровень ингибина А в сыворотке крови женщин, страдающих хроническим трихомонозом, как предиктор развития бесплодия *Казанский мед. ж.* 2019; 100 (5): 779–784. DOI: 10.17816/KMJ2019-779.

The level of inhibin A in the blood serum of women suffering from chronic trichomoniasis as a predictor of infertility

N.I. Gudinskaya¹, O.V. Boyko¹, N.A. Gribova², R.I. Mukhamedzyanova¹

¹Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia;

²Clinical Maternity Hospital, Astrakhan, Russia

Abstract

Aim. To determine the relationship between the level of inhibin A and biochemical factors of inflammation with the development of infertility in women suffering from chronic trichomoniasis.

Methods. The object of the study was the blood serum of 167 women suffering from chronic trichomoniasis. The level of inhibin A was determined by enzyme immunoassay. As a control, the blood serum of 22 practically

healthy fertile women was used who had no history of trichomoniasis. The lymphocyte phenotype was determined using luminescent microscopy with monoclonal antibodies staining. The level of immunoglobulins in serum was determined by the standard Mancini method of radial immunodiffusion. The synthesis of cytokines was determined by the method of studying the spontaneous synthesis of interleukins-1 β , -8, -10 and interferon γ . The level of cytokines and lactoferrin was evaluated by enzyme immunoassay. The concentrations of α_2 -macroglobulin and C-reactive protein were determined by the nephelometric method. The fibrinogen concentration was determined by the coagulometric method.

Results. In the group of patients with chronic trichomoniasis, a significant variability in the serum concentration of inhibin A from 4.3 to 29.4 ng/L was found. In a group of patients who had a reduced content of inhibin A, in 63.2% of cases, the development of secondary infertility was subsequently diagnosed; in the group of patients who had a normal level of inhibin A, secondary infertility developed only in 12.9% of cases.

Conclusion. It was found that among all acute phase proteins, only levels of C-reactive protein and lactoferrin have prognostic value and statistically significantly differ in groups of women with subsequently developed infertility and uncomplicated infertility trichomoniasis.

Keywords: inhibin A, C-reactive protein, interleukins, fibrinogen, α_2 -macroglobulin, lactoferrin, trichomoniasis, infertility.

For citation: Gudinskaya N.I., Boyko O.V., Gribova N.A., Mukhamedzyanova R.I. The level of inhibin A in the blood serum of women suffering from chronic trichomoniasis as a predictor of infertility. *Kazan medical journal*. 100 (5): 779–784. DOI: 10.17816/KMJ2019-779.

Ингибин А — белок, выделяемый зернистыми клетками яичников и влияющий на секрецию фолликулостимулирующего гормона. Ингибин А содержится в плазме крови, а также в большом количестве — в фолликулярной жидкости. Его основная функция — подавление секреции гипофизом фоллитропина путём воздействия на гипоталамус по принципу обратной связи. Молекулярный вес «развитой» формы ингибина А составляет 32 000 Да. Ингибин А состоит из одной α -цепочки (~18 кДа) и одной β -цепочки (~14 кДа), которые соединены дисульфидными мостиками. Ингибин А относится к группе внутриклеточных сигнальных Smad-белков [1, 2].

Концентрация сывороточного ингибина А у женщин в норме во время менструального цикла повышается от 15,1 \pm 2,6 пг/мл в ранней фолликулярной фазе до 69,2 \pm 11,3 пг/мл в средней лютеиновой фазе. Содержание ингибина А в фолликулярной жидкости составляет 488 нг/мл. У женщин после менопаузы уровень ингибина А снижается и составляет менее 2 пг/мл [3].

Ингибин А играет существенную роль в течении беременности. Исследования показали, что жёлтое тело яичника (или фетоплацентарная единица) служит главным поставщиком ингибина А. Известно, что уровень этой субстанции в крови пациенток отражает количество и качество антральных фолликулов, что определяет овариальный резерв. Возрастное снижение плодовитости, связано, прежде всего, с уменьшением овариального резерва и качества овоцита, однако и молодые пациентки

могут иметь сниженный овариальный резерв как осложнение после перенесённых воспалительных заболеваний или инфекций, передающихся половым путём [4–6].

В то же время, как полагают ряд учёных, наличие у пациенток воспалительного процесса, сопровождающегося появлением в сыворотке крови биохимических факторов воспаления, может снижать уровень ингибина А. К ним следует отнести, прежде всего, цитокины и острофазовые белки. Выяснение причин снижения уровня и активности ингибина А у женщин, страдающих воспалительными заболеваниями репродуктивной системы и, в том числе, инфекционными заболеваниями, поможет не только повысить качество диагностики, но и выявит новые возможности в разработке методов лечения женского бесплодия [7, 8].

Целью исследования было определение взаимосвязи уровня ингибина А и биохимических факторов воспаления с развитием бесплодия у женщин, страдающих хроническим трихомонозом.

Объектом исследования служила сыворотка крови 167 женщин в возрасте 22–29 лет (средний возраст 24,1 \pm 3,45 года), находившихся на амбулаторном лечении в женской консультации городской поликлиники №8 г. Астрахани с 2012 по 2018 гг. и страдающих хроническим трихомонозом (согласно Международной классификации болезней 10-го пересмотра: «Хроническая инфекция — длительность инфекции более 2 мес»).

Критериями включения пациенток в исследование были возраст и наличие диагноза

«Хронический трихомоноз». Для подтверждения диагноза использовали метод бактериального посева на питательные среды, который проводили в централизованной лаборатории Астраханского областного кожно-венерологического диспансера.

В качестве контроля была использована сыворотка крови 22 практически здоровых фертильных женщин 22–29 лет, проходивших ежегодный профилактический осмотр (средний возраст $25,0 \pm 1,21$ года), не страдающих трихомонозом и не имевших заболеваний, передающихся половым путём. Сравнение групп по полу и возрасту не выявило статистически значимых различий ($p > 0,05$).

Исследование одобрено локальным этическим комитетом городской поликлиники №8 г. Астрахани (протокол №15 от 21.11.2012).

У всех обследованных на 3–5-й день менструального цикла методом иммуноферментного анализа определяли сывороточный уровень ингибина А в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения [8].

Забор крови осуществляли из локтевой вены утром, строго натощак, после чего её центрифугировали в режиме 3000 об./мин в течение 10 мин, затем консервировали 1% раствором азида натрия.

Определение фенотипа лимфоцитов осуществляли окрашиванием их моноклональными антителами (производство ГНЦ «Институт иммунологии МЗ России», Москва) с последующим использованием люминесцентного микроскопа.

Уровень иммуноглобулинов в сыворотке крови оценивали стандартным методом радиальной иммунодиффузии по Манчини с использованием моноспецифических антисывороток (НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва). Содержание иммуноглобулинов выражали в мг/%.

Цитокины определяли путём исследования спонтанного синтеза интерлейкинов (ИЛ) — ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИЛ-10, а также интерферона γ (ИФН γ). Лимфоидные клетки предварительно инкубировали в течение 24 ч, после чего методом иммуноферментного анализа определяли концентрацию данных цитокинов. Для определения содержания ИЛ-1 β и ИЛ-8 использовали тест-системы компании «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург, Россия); ИЛ-10 и ИФН γ — Immunotech (Франция).

Концентрацию лактоферрина определяли иммуноферментным методом с помощью тест-систем производства ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург, Россия). Концентрации α_2 -макроглобулина и С-реактивного белка

(СРБ) определяли нефелометрическим методом. Концентрацию фибриногена оценивали коагулологическим методом.

Концентрация ингибина А в сыворотке крови контрольной группы на 3–5-й день менструального цикла составляла $15,2 \pm 2,4$ пг/мл ($10,8$ – $19,2$ пг/мл). В группе больных трихомонозом отмечена высокая вариабельность результатов — от 4,3 до 29,4 пг/мл, поэтому больные были разделены на две группы — с низким и нормальным уровнем ингибина А.

В группу с нормальной концентрацией ингибина А вошли 129 пациенток. Содержание ингибина А варьировало от 10,4 до 29,4 пг/мл, в среднем по группе составляло $16,2 \pm 2,4$ пг/мл. Группы сравнительного анализа были сопоставимы по полу, возрасту и наличию диагноза «Трихомоноз».

Во вторую группу вошли 38 пациенток (22,8% общего числа обследованных больных). Концентрация ингибина А у них в крови колебалась от 5,3 до 9,1 пг/мл, среднее значение составило $8,23 \pm 0,81$ пг/мл.

Статистический анализ полученных данных выполняли с помощью программы IBM SPSS Statistics v. 21 (IBM Corp., Armonk, NY, США). Для каждой выборки вычисляли показатели описательной статистики: количество наблюдений в исходной выборке (n), среднее арифметическое полученных значений (M), среднее квадратическое отклонение (m), стандартную ошибку среднего арифметического, минимальное (\min) и максимальное (\max) значения изучаемого признака, а также показатели относительных величин (%) и их ошибки. Вид распределения количественных данных анализировали с помощью критерия Шапиро–Уилка. После оценки соответствия нормальному закону распределения выбирали метод статистического анализа (параметрический или непараметрический). При нормальном распределении количественных переменных центральные тенденции и рассеяния признаков описаны с помощью среднего значения (M) и среднего квадратического отклонения (m). При распределении количественных признаков, отличном от нормального, описание проводили с помощью медианы (Me) и 25–75% интерквартильного размаха (LQ ; UQ). Доверительные интервалы рассчитывали для вероятности $p=95\%$. Различия между сравниваемыми параметрами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Для расчёта статистической значимости различий в двух связанных группах использовали t -критерий Стьюдента, в двух несвязанных

Таблица 1. Уровни маркёров воспаления в крови женщин, страдающих хроническим трихомонозом

Маркёры воспаления	Группы обследованных		p
	Контрольная группа (n=22)	Больные трихомонозом (n=167)	
Интерлейкин-1 β	103,6 \pm 8,4	292,5 \pm 12,1	0,00081
Интерлейкин-8, пг/мл	19,8 \pm 2,5	10,9 \pm 2,1	0,00092
Интерферон γ	25,1 \pm 1,6	8,3 \pm 1,1	0,00041
Интерлейкин-10, пг/мл	178,3 \pm 41,5	1565,0 \pm 123,0	0,00024
Иммуноглобулин А, мг%	143,0 \pm 11,2	203,0 \pm 19,0	0,040
Иммуноглобулин М, мг%	122,0 \pm 9,30	137,1 \pm 12,0	0,052
С-реактивный белок, мкг/мл	0,30 \pm 0,01	19,5 \pm 0,80	0,000011
Лактоферрин, нг/мл	445,1 \pm 104,0	3475,0 \pm 178,1	0,00079
α_2 -Макроглобулин, мкг/мл	190,0 \pm 18,1	187,0 \pm 24,2	0,97
Фибриноген, мг/мл	1,7 \pm 0,8	1,6 \pm 0,95	0,90

группах — t-критерий Стьюдента или непараметрический критерий Манна–Уитни.

Для устранения возникновения проблемы множественных сравнений выполняли однофакторный дисперсионный анализ в сравнении со стандартным значением критерия Фишера (F) с использованием рангового анализа вариаций по Краскелу–Уоллису. При $p < 0,05$ принимали альтернативную гипотезу о различии групп и проводили парное сравнение групп с помощью критерия Манна–Уитни.

Анализ историй болезни показал, что в первой группе больных с нормальным уровнем ингибина А в ходе заболевания вторичное бесплодие развилось в 23,3% случаев (34 женщины). У 30 пациенток оно сопровождалось снижением овариального запаса, симптомами которого были нарушения менструальной функции, ановуляция и невынашиваемость беременности. У 4 пациенток развилось бесплодие, связанное с трубными и перитонеальными факторами.

В группе пациенток со сниженным уровнем ингибина А в течение заболевания у 24 женщин развилось вторичное бесплодие, что составляло 63,20% общего числа обследованных. Бесплодие у женщин этой группы также было связано со снижением овариального запаса. У 2 женщин развилось бесплодие, связанное с трубными и перитонеальными факторами.

Полученные данные об уровне маркёров воспаления в сыворотке крови женщин, страдающих хроническим трихомонозом, представлены в табл. 1.

Для описания функционального состояния Т-хелперов (Th1 и Th2) у пациенток определили содержание ИФН γ , ИЛ-8 и ИЛ-1 β .

В группе контроля концентрация ИЛ-1 β мононуклеарами *in vitro* составила 103,6 \pm 8,4 пг/мл и колебалась от 96,0 до 112,0 пг/мл. У пациенток с хроническим трихомонозом показатель спонтанного синтеза ИЛ-1 β был существенно выше и составлял 292,5 \pm 12,1 пг/мл ($p=0,00081$).

В группе контроля концентрация ИЛ-8 была 19,8 \pm 2,3 пг/мл, в группе больных показатель спонтанного синтеза ИЛ-8 был ниже контрольных значений и составлял только 10,9 \pm 2,1 пг/мл ($p=0,00092$), что позволяет предположить наличие связи между уменьшением синтеза этого цитокина и снижением фагоцитарной активности нейтрофилов.

Концентрация ИФН γ в сыворотке крови контрольной группы составила 25,10 \pm 1,60 пг/мл, в то время как у больных спонтанный синтез ИФН γ был почти в 3 раза меньше и составил 8,3 \pm 1,1 пг/мл ($p=0,00041$). Очевидно, что недостаточность синтеза ИФН γ , с одной стороны, отражает нарушение функциональной активности CD4 $^{+}$ -клеток у больных, а с другой — может приводить к состоянию толерантности к инфекции.

Спонтанный синтез ИЛ-10 в группе контроля составлял от 116,0 до 250,0 пг/мл (в среднем 178,3 \pm 41,5 пг/мл), в то время как у больных он повышался до 1565,0 \pm 123,0 пг/мл, то есть более чем в 8 раз ($p=0,00024$).

Содержание иммуноглобулинов А и М у больных в целом соответствовало контрольным значениям, хотя у двух третей пациенток выявлено изменение их соотношения (повышение уровня иммуноглобулина А и/или снижение иммуноглобулина М).

Таким образом, результаты исследования цитокинового профиля у женщин с хрониче-

ским трихомонозом вполне убедительно демонстрируют преобладание формирования иммунного ответа по типу Th2.

Известно, что цитокины инициируют синтез гепатоцитами вторичных медиаторов воспаления — белков острой фазы. Содержание СРБ в сыворотке крови контрольной группы составило $0,3 \pm 0,01$ мкг/мл. У больных выявлено возрастание его уровня более чем в 65 раз — до $19,5 \pm 0,8$ мкг/мл ($p=0,000011$), однако это значительно ниже, чем при большинстве бактериальных инфекций, и более характерно для хронических вирусных заболеваний [9, 10].

Уровень лактоферрина в крови контрольной группы составил $445,0 \pm 104,0$ нг/мл. В группе больных его концентрация превышена почти в 8 раз — до $3475,0 \pm 178,0$ нг/мл ($p=0,00079$). Такие значения гораздо чаще отмечают при острых инфекциях, в том числе и заболеваниях, передающихся половым путём, они совсем не типичны для большинства хронических бактериальных инфекций [11, 12].

В последующем был проведён ретроспективный анализ вариационных рядов, при котором полученные результаты группировали вне зависимости от концентрации ингибина А и изучаемых факторов воспаления, в их взаимосвязи с состоянием репродуктивной функции женщин, страдающих трихомонозом.

Как уже было упомянуто выше, у 30 больных с нормальным уровнем ингибина А отмечено развитие бесплодия, у остальных фертильность сохранена или о её нарушениях нет достоверных данных. Анализ показал, что концентрация только двух маркёров воспаления в крови женщин, страдающих трихомонозом (СРБ и лактоферрина), имеет различия между женщинами с нарушениями фертильности и без её нарушения. Естественно предположить, что эти маркёры воспаления в определённой степени связаны с развитием нарушений репродуктивной функции у женщин, страдающих трихомонозом.

Мы допускаем возможность образования в сыворотке крови пациенток комплексов ингибин А-лактоферрин, которые могут снижать биологическую активность ингибина А. Это реализуется, как минимум, двумя механизмами. Во-первых, это может быть результатом электростатического взаимодействия нескольких молекул ингибина А, несущих достаточно высокий отрицательный заряд, с поликатионом лактоферрином. Во-вторых, возможен механизм преимущественно гидрофобного взаимодействия молекул лактоферрина и ингибина А.

Влияние СРБ на активность ингибина А вряд ли можно также объяснить образованием комплексов. Вероятнее всего, оно носит системный характер и обусловлено влиянием высоких концентраций СРБ на функционирование ингибина А на уровне целостного организма. В частности, возможно влияние СРБ на синтез ИЛ-1 β в фолликулах яичников, так как этот цитокин синтезируется гранулёзой, и его высокая концентрация в фолликулярной жидкости коррелирует со степенью зрелости и частотой оплодотворения овоцита. С другой стороны, ИЛ-1 β — провоспалительный цитокин, играющий существенную роль в развитии воспалительной реакции, поскольку способен индуцировать бóльшую часть местных и общих её проявлений. Известно также, что высокие концентрации СРБ (10 мкг/мл и выше) способны ингибировать синтез ИЛ-1 β наряду с простагландином E_2 и глюкокортикоидами.

Итак, в группе больных хроническим трихомонозом обнаружена существенная вариабельность концентрации ингибина А ($4,3$ – $29,4$ нг/л). В группе больных, имевших сниженные уровни ингибина А, в 63,2% случаев диагностировано в последующем развитие вторичного бесплодия, в то время как в группе больных, имевших нормальное содержание ингибина А, вторичное бесплодие развилось только в 12,9% случаев ($p=0,00023$). Установлено, что из всех белков острой фазы только уровни СРБ и лактоферрина имеют прогностическое значение и статистически значимо ($p=0,0005$ и $p=0,0009$ соответственно) различаются между группой больных с развившимся впоследствии бесплодием и группой пациенток без развившегося бесплодия.

ВЫВОД

Из всех белков острой фазы только уровни С-реактивного белка и лактоферрина имеют прогностическое значение и статистически значимо различаются в группах женщин с развившимся впоследствии бесплодием и не осложнённым бесплодием трихомонозом.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ahmad I., Jagtap D.D., Selva Kumar C. et al. Molecular characterization of inhibin-A: Structure and expression analysis in *Clarias batrachus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2018; 261: 104–114. DOI: 10.1016/j.ygcen.2018.02.007.
2. Kristensen S.G., Mamsen L.S., Jeppesen J.V. et al. Hallmarks of human small antral follicle development: Implications for regulation of ovarian steroidogenesis and se-

lection of the dominant follicle. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2018; 8: 376. DOI: 10.3389/fendo.2017.00376.

3. Singnoi W., Wanapirak C., Sekararithi R., Tong-song T. A cohort study of the association between maternal serum Inhibin-A and adverse pregnancy outcomes: a population-based study. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2019; 19 (1): 124. DOI: 10.1186/s12884-019-2266-y.

4. Gallastegui N., Coe R.M., Torres A., Harrington T.J. Thrombocytopenia associated with high levels of inhibin. A case study. *Blood Cells Mol. Dis*. 2019; 76: 22–24. DOI: 10.1016/j.bcmd.2019.01.001.

5. Pangas S.A., Rademaker A.W., Fishman D.A., Woodruff T.K. Localization of the activin signal transduction components in normal human ovarian follicles: implications for autocrine and paracrine signaling in the ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87 (6): 2644–2657. DOI: 10.1210/jcem.87.6.8519.

6. Baerwald A., Vanden Brink H., Hunter C. et al. Age-related changes in luteal dynamics: preliminary associations with antral follicular dynamics and hormone production during the human menstrual cycle. *Menopause*. 2018; 25 (4): 399–407. DOI: 10.1097/GME.0000000000001021.

7. Gaccioli F., Aye I.L.M.H., Sovio U. et al. Screening for fetal growth restriction using fetal biometry combined with maternal biomarkers. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2018; 218 (2S): S725–S737. DOI: 10.1016/j.ajog.2017.12.002.

8. Bukulmez O., Arici A. Assessment of ovarian reserve. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 2004; (16): 231–237. DOI: 10.1097/00001703-200406000-00005.

9. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека. *Мед. академ. ж.* 2013; (3): 18–41. [Simbirtsev A.S. Cytokines in the pathogenesis of human infectious and non-infectious diseases. *Meditsinskiy akademicheskij zhurnal*. 2013; (3): 18–41. (In Russ.)]

10. Бойко О.В., Ахминеева А.Х., Бойко В.И., Гудинская Н.И. Влияние Астраханского газоперерабатывающего завода на загрязнение воздуха производственных помещений и территории. *Гигиена и санитария*. 2016; 95 (2): 167–171. [Boyko O.V., Akhmineeva A.H., Boyko V.I., Gudinskaya N.I. Influence of Astrakhan gas processing plant on the air pollution by harmful chemical substances of industrial premises and the territory. *Gigiena i sanitariya*. 2016; 95 (2): 167–171. (In Russ.)]

11. Askari S.G., Khatbasreh M., Ehrampoush M.H. et al. The relationship between environmental exposures and hormonal abnormalities in pregnant women: An epidemiological study in Yazd, Iran. *Women Birth*. 2018; 31 (3): e204–e209. DOI: 10.1016/j.wombi.2017.09.002.

12. Бойко О.В., Терентьев А.А., Николаев А.А., Чомаев А.М. *Молекулярные механизмы персистирующей инфекции*. Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет». 2006; 127 с. [Boyko O.V., Terent'ev A.A., Nikolaev A.A., Chomaev A.M. *Molekulyarnye mekhanizmy persistiruyushchey infektsii*. (Molecular mechanisms of persistent infection.) Astrakhan: Izdatel'skiy dom "Astrahanskiy universitet". 2006; 127 p. (In Russ.)]