

**ОПИСАНИЕ  
ИЗОБРЕТЕНИЯ  
К ПАТЕНТУ**

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ  
СОБСТВЕННОСТИ

(19) **ВУ** (11) **23817**

(13) **С1**

(46) **2022.10.30**

(51) МПК

*A 61L 15/22* (2006.01)

*C 08L 29/04* (2006.01)

*C 08J 3/075* (2006.01)

(54) **КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БАКТЕРИЦИДНОГО  
КРИОГЕЛЯ В ЭЛЕКТРЕТНОМ СОСТОЯНИИ**

(21) Номер заявки: а 20200100

(22) 2020.03.25

(43) 2021.10.30

(71) Заявители: Государственное научное учреждение "Институт механики металлополимерных систем имени В.А. Белого Национальной академии наук Беларуси"; Учреждение образования "Гомельский государственный медицинский университет" (ВУ)

(72) Авторы: Цветкова Елена Александровна; Ухарцева Ирина Юрьевна; Гольдаде Виктор Антонович; Концевая Ирина Ильинична; Зотов Сергей Валентинович; Каплан Марк Львович; Шаповалов Виктор Михайлович; Лызиков Алексей Анатольевич; Кадолич Жанна Владимировна; Панкова Елизавета Николаевна; Сильвистрович Виктория Иосифовна (ВУ)

(73) Патентообладатели: Государственное научное учреждение "Институт механики металлополимерных систем имени В.А. Белого Национальной академии наук Беларуси"; Учреждение образования "Гомельский государственный медицинский университет" (ВУ)

(56) ЦВЕТКОВА Е.А. и др. Материал для эндопротеза кровеносного сосуда на основе высокомолекулярных соединений. Вестник технологического университета, 2016, т. 19, № 20, с. 58, 60, 61.

МАКАРЕНКО М.В. и др. Современные подходы к разработке раневых покрытий. Труды БГУ. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем, 2016, т. 11, ч. 1, с. 274, 276, 278.

RU 2252945 С1, 2005.

RU 2494746 С1, 2013.

RU 2422133 С1, 2011.

UA 70903 U, 2012.

UA 97930 U, 2015.

CN 105641740 A, 2016.

(57)

Композиция для получения бактерицидного криогеля в электретном состоянии, содержащая поливиниловый спирт, хитозан, глицерин, настойку прополиса 1:10 на 80%-ном водном растворе этанола, аскорбиновую кислоту, пектин и дистиллированную воду при следующем соотношении компонентов, мас. %:

поливиниловый спирт	5-10
хитозан	0,5-5,0
глицерин	3-10
настойка прополиса	0,03-0,05
аскорбиновая кислота	0,005-0,01
пектин	6-10
дистиллированная вода	остальное.

**ВУ 23817 С1 2022.10.30**

Изобретение относится к композиционным материалам для медицины и биотехнологии, в частности к средствам для лечения ран различной этиологии, ожогов, гнойно-трофических язв и абсцессов.

Основными требованиями к композиционным материалам, оказывающим бактерицидное действие, являются следующие: возможность введения в них лекарственных средств (ЛС), обеспечение защиты раны от инфицирования, отсутствие токсического воздействия, стимулирование регенерации поврежденных тканей, высокая адсорбционная способность и безболезненное удаление.

Одним из активно развивающихся направлений в биоматериаловедении является создание систем направленного действия на основе био- и нанотехнологий. Для разработки таких систем применяют широкий спектр высокомолекулярных соединений, которые служат подложками или носителями иммобилизованных биологически активных веществ (БАВ). Использование БАВ в сочетании с полимерными материалами позволяет придать композициям совершенно новые свойства и значительно повысить их эффективность. Кроме того, особенности патогенеза ран различной этиологии обуславливают необходимость использования широкого спектра лекарственных средств при различной длительности лечения ран. Однако применение комплексов лекарственных средств не всегда дает положительный эффект, в частности из-за их несовместимости в одном препарате, и может сопровождаться аллергическими реакциями.

Накоплен большой опыт создания композиций, содержащих различные ЛС и биополимеры, для заживления ран.

Известно раневое покрытие на основе коллаген-хитозанового комплекса для восстановления дефектов кожи в виде губки, геля, коллоидного раствора, пленки. Хитозановая составляющая комплекса содержит хитозан со степенью деацетилирования 0,95-0,99 и молекулярной массой 100-1000 kDa в виде аскорбата хитозана при содержании аскорбиновой кислоты 1,8 г/г сухого хитозана, а также хондроитинсерную кислоту - 5-100 мг/г сухого хитозана, гиалуроновую кислоту - 10-100 мг/г сухого хитозана, гепарин - 2,5-5 мг/г сухого хитозана и сывороточный фактор роста крупного рогатого скота - 11-220 мкг/г сухого хитозана [1]. Покрытие может быть использовано для восстановления полнослойных кожных дефектов различной площади в качестве искусственной матрицы дермально-эпидермального эквивалента кожи.

Недостатки композиции:

недостаточная стабильность консистенции;

низкая резистентность коллагена по отношению к протеолитическим микроорганизмам;

высокая стоимость применяемого фактора роста;

высокое содержание аскорбиновой кислоты, что может отрицательно влиять на кожные покровы пациентов, страдающих тромбозом, склонных к тромбозам и сахарному диабету [2].

Известна бактерицидная гидрофильная композиция на основе поливинилового спирта (ПВС) для макропористого сшитого материала, полученного полимеризацией в водных замороженных растворах поливинилового спирта [3]. Композиция содержит дистиллированную воду, перекись водорода, аскорбиновую кислоту и модифицированный ПВС, полученный введением в боковую цепь радикала с одной или двумя ненасыщенными группами, в условиях радикальной полимеризации и сополимеризации которых обеспечивается образование пространственной структуры, которая формирует макропористый сшитый полимерный материал с повышенной термостабильностью, развитой пористостью и высокой дренирующей способностью.

Недостатки композиции:

отсутствие данных о введении ЛС в сформированную сшитую систему;

сложность аппаратно-приборного обеспечения направленной радикальной полимеризации (сополимеризации);

образование нерегулярной структуры у сшитых сополимеров в процессе полимеризации.

Наиболее близкой к заявляемому объекту по технической сущности является бактерицидная гидрофильная композиция [4], содержащая ПВС, полиспирты, хитозан, вспомогательные вещества и воду. Композиция имеет гелевую консистенцию, образованную редкосшитым полимером хитозана и полианионного гидроколлоида, имеющим 2-3 сшивки сополимеров на молекулу хитозана и распределенные в нем в микрочастицы серебра, азотнокислый церий, поливинилпирролидон и др.

Недостатки прототипа:

в качестве основы композиции использован дорогостоящий сополимерный комплекс, содержащий большое количество компонентов, по функциям дублирующих друг друга;

технология получения материала включает множество операций (криообработка, автоклавирование, СВЧ- и УЗ-обработка), что увеличивает его стоимость.

Задача, на решение которой направлено изобретение, - разработка композиции для получения бактерицидного криогеля, получаемой по несложной дешевой технологии, обладающей высокими сорбирующими свойствами и формоустойчивостью. Требуемый технический результат:

формирование прочной пористой гидрофильной эластичной формоустойчивой матрицы;

возможность иммобилизации в матрицу биологически активных веществ, обладающих бактерицидным эффектом;

повышение сорбционной способности композиционного материала к иммобилизуемым агентам;

обеспечение реализации электретного эффекта, регулирующего кинетику выделения активных компонентов из полимерной матрицы;

эргономичность получения композиции.

Указанный технический результат достигается тем, что заявляется композиция для получения бактерицидного криогеля в электретном состоянии, содержащая поливиниловый спирт, хитозан, глицерин, настойку прополиса 1:10 на 80%-ном водном растворе этанола, аскорбиновую кислоту, пектин и дистиллированную воду при следующем соотношении компонентов, мас. %: поливиниловый спирт 5-10, хитозан 0,5-5,0, глицерин 3-10, настойка прополиса 0,03-0,05, аскорбиновая кислота 0,005-0,01, пектин 6-10, дистиллированная вода - остальное.

Сущность изобретения состоит в следующем.

Медицинские гидрогели на основе ПВС проявляют устойчивость к биологической деградации, могут длительно находиться в контакте с живым организмом, пригодны для приготовления биосовместимых антитромбогенных препаратов, могут элиминировать биологически активные вещества, стимулировать или ингибировать действие ферментов, быть основой для выращивания живых клеток, участвовать в сорбции и десорбции протеинов, очистке и разделении фармацевтических и биологических субстанций. Пленки на основе наполненных гидрогелей ПВС характеризуются анизотропией свойств и применяются для создания кожных аппликаций [5]. Поэтому заявляемая композиция содержит ПВС аналогично прототипу. Этот полимер является хорошим гелеобразователем, что связано с наличием большого количества гидроксильных групп в составе изотактических звеньев цепи, участвующих в образовании межмолекулярных и внутримолекулярных водородных связей. Кроме того, ПВС является относительно дешевым и крупнотоннажно выпускаемым полимером. В гидрогелях ПВС уже при небольшой концентрации полимера (3-5 мас. %) макромолекулы образуют стереохимически и термодинамически устойчивую пространственную сетку из структур кластерного типа, звенья которой соединены физическими или химическими связями. Содержание ПВС в композиции менее 3 мас. % обуславливает недостаточные пленкообразующие свойства, а более 10 мас. % - технологически не оправдано, поскольку при приготовлении такой композиции увеличивается ее вязкость.

Комбинация поливинилового спирта, хитозана и глицерина создает возможность регулирования упругости и эластичности полимерной матрицы, которая, в свою очередь, служит превосходным носителем иммобилизованных биологически активных соединений. Хитозан и препараты на его основе широко используются в медицине в качестве иммуностимуляторов, для агрегации клеток при лейкемии (N-ацетилхитин), а также для снятия болевых ощущений и адсорбции экссудата. Одной из характерных особенностей хитозана - природного полимера, относящегося к классу полисахаридов и являющегося продуктом диацетилирования хитина, является способность к образованию различных смесевых композиций. Содержание хитозана в количестве 0,5-5,0 мас. % достаточно для создания электретного состояния и достижения оптимальных физико-механических свойств. Повышение содержания хитозана в композиции приводит к повышению жесткости материала. Глицерин представляет собой трехатомный спирт, широко используемый в пищевой промышленности, медицине и косметологии. Он гипоаллергенен. Введение его в композицию связано с пластифицирующими, антисептическими свойствами, а также необходимо для предотвращения высыхания материала.

Настойку прополиса применяют в качестве ранозаживляющего и противовоспалительного средства при микротравмах и поверхностных повреждениях кожных покровов, слизистых оболочек и др. Она обладает бактерицидным, антисептическим, противовирусным и анестезирующим действием [6]. Содержание настойки прополиса определено экспериментально. Уменьшение содержания не способствует достижению указанного технического результата, а увеличение может вызвать аллергическую реакцию.

Аскорбиновая кислота (витамин С) участвует в регулировании окислительно-восстановительных процессов, углеводного обмена, свертываемости крови, регенерации тканей, синтезе коллагена и проколлагена; повышает устойчивость организма к инфекциям, уменьшает сосудистую проницаемость, снижает потребность в витаминах В1, В2, А, Е, фолиевой кислоте, пантотеновой кислоте [7]. Смесь настойки прополиса и аскорбиновой кислоты эффективно действует на грамположительные и грамотрицательные бактерии (включая резистентные к антибиотикам штаммы), на вирусы, а также выполняет в композиции функцию противовоспалительного агента, ускоряющего заживление поврежденных кожных покровов и тканей.

Пектин, наряду со своими уникальными физико-химическими, биологическими и медицинскими свойствами (иммуномодулятор, сорбент и др.), обеспечивает липкость всей композиции, что исключает дополнительную операцию фиксации на теле аппликационного материала.

Криообработка композиции позволяет получить водонерастворимый материал с заданными физико-механическими свойствами и высокой формоустойчивостью за счет формирования более упорядоченной структуры. Криогелизация инициирует развитие криолитических процессов, приводящих к образованию в системе "полимер-вода" активных криолизатов - свободных радикалов и ион-радикалов с сильно локализованными неспаренными электронами, которые взаимодействуют с макромолекулами и другими активными компонентами системы. Процесс криолиза сопровождается дополнительным структурированием полимера с образованием поперечных связей между макромолекулами. В результате формируется криогель, надмолекулярная структура и механические свойства которого зависят от концентрации полимера, температуры и длительности криообработки, а также от условий и скорости размораживания геля [8].

Полимерный материал на основе криогеля ПВС обладает сравнительно высоким ( $\epsilon = 3,0$ ) значением диэлектрической проницаемости, благодаря чему способен сохранять поляризационный (электретный) заряд по времени. Электретное состояние, реализуемое в материале, способствует регулированию процессов сорбции и десорбции активных компонентов за счет возможности регулирования гидрофильно-гидрофобного баланса, способствует улучшению биосовместимости, а также в оптимальных биофизических

## ВУ 23817 С1 2022.10.30

условиях оказывает лечебный эффект посредством влияния на процессы ранозаживления за счет регулируемого воздействия поля электретенного заряда [9].

В совокупности предложенный состав композиции способствует реализации триады основных требуемых свойств кожного аппликатора: формоустойчивость, возможность фиксации на теле, способность оказывать противовоспалительное, ранозаживляющее и бактерицидное действие.

Приведем пример реализации изобретения.

Для получения бактерицидного криогеля применяли порошок ПВС (ГОСТ 10779, марка М ХЧ), хитозан (пищевой, ТУ 9289-067-00472124-03), глицерин (ГОСТ 6259-75), настойку прополиса (пр-во "Борисовский завод медицинских препаратов"), аскорбиновую кислоту (ТУ 64-5-95), пектин (натуральный растительный, ТУ 9169-007-52303135-14), воду дистиллированную при следующем соотношении компонентов, мас. %:

поливиниловый спирт	5-10
хитозан	0,5-5,0
глицерин	3-10
настойка прополиса	0,03-0,05
аскорбиновая кислота	0,005-0,01
пектин	6-10
дистиллированная вода	остальное.

Суспензию порошка ПВС в дистиллированной воде медленно нагревали до 80 °С при постоянном помешивании в течение 1,5 ч для набухания частиц полимера. Затем температуру повышали до 95 °С, выдерживали 2 ч при этой температуре, охлаждали полученный однородный раствор до 70 °С и в него постепенно небольшими порциями при постоянном помешивании вводили порошок пектина. Затем полученный раствор охлаждали до комнатной температуры и последовательно вводили хитозан, глицерин, настойку прополиса и аскорбиновую кислоту. Полученную композицию заливали в формы и помещали в хладотермостат, замораживали со скоростью ~2 °С/мин и выдерживали при температуре минус 12 °С в течение 24 ч. Цикл обработки образца "замораживание - оттаивание" осуществляли дважды и при медленной скорости оттаивания  $v$  менее 1 °С [10]. Получали образцы средней толщины  $\delta = 2,5-3,0$  мм, обладающие высокой пористостью (35-40 %), характерной для гелей, и адгезией к поверхности кожи (0,2-0,4 Н/см), достаточной для удержания без дополнительной фиксирующей повязки. Затем полученный криогелевый образец подвергали модифицированию в коронном разряде отрицательной полярности по стандартной методике получения короноэлектретов [11] с достижением эффективной поверхностной плотности заряда не менее 3 нКл/см<sup>2</sup>. Образование заряда может быть обусловлено тем, что входящий в состав композиции ПВС является легко поляризуемым диэлектриком, а хитозан - природным электретом. Их взаимодействие в составе матрицы ведет к образованию пространственной структуры с "замороженными" диполями. Предлагаемая нами обработка в коронном разряде усиливает этот эффект, придавая композиции электретенные свойства, что отличает ее от прототипа.

При концентрации ПВС ниже 5 мас. % гель в целом формируется, обеспечивая функциональные медицинские свойства. Однако гель при этой концентрации ПВС хотя и не растекается, но слишком мягок и сползает с поверхности кожи в случае любого движения, а после сорбции экссудата из-за сравнительно большого количества влаги наблюдается разрушение целостности материала. В данном случае исследование прочности нецелесообразно.

Для сравнительной оценки прочности экспериментальных образцов применяли метод пенетрации [12]. Установлено, что оптимальное содержание ПВС в композиции составляет 5-10 мас. %, что позволяет достичь прочность в диапазоне 0,6-0,9 МПа. Оптимальное содержание глицерина в композиции, удовлетворяющее ее формоустойчивости и медицинским требованиям, находится в диапазоне от 3 до 10 мас. %. При концентрации глице-

рина менее 3 мас. % снижается эластичность композиции. При увеличении концентрации глицерина выше 10 мас. % наблюдается значительное повышение прочности композиции и синерезис глицерина, что сказывается на ухудшении эргономических свойств.

Оптимальное содержание хитозана экспериментально установлено в диапазоне от 0,5 до 5,0 мас. %. Содержание хитозана в композиции менее 0,5 мас. % недостаточно для обеспечения сорбционных свойств. Повышение содержания хитозана выше 5 мас. % ограничено технологическими параметрами: композиция становится очень вязкой, что затрудняет получение конечного продукта с оптимальными физико-механическими характеристиками, обеспечивающими моделирование любого профиля поверхности кожи человека.

Предлагаемое содержание пектина от 6 до 10 мас. % достаточно для выполнения адгезионной и сорбционной функций, хотя возможно и повышение его до 20 мас. %, что не влияет на формоустойчивость композиции. Однако повышенное содержание пектина увеличивает адгезию к коже, что сопряжено с болевыми ощущениями и опасностью травмирования раневой поверхности при снятии.

Содержание в композиции настойки прополиса и аскорбиновой кислоты не оказывает значительного влияния на ее физико-механические свойства, а влияет на бактерицидность и ольфакторное восприятие.

Предлагаемые соотношения компонентов позволяют получить формоустойчивый композит, способный моделировать любой профиль поверхности тела, легко и безболезненно отделяться от раны, не разрушая вновь образовавшуюся эпителиальную ткань, а также имеющий приятный запах.

Бактерицидные свойства композита в сравнении с прототипом оценивали микробиологическим методом. В качестве тест-штаммов использовали две референсные антибиотикочувствительные культуры Американской коллекции типовых культур (АТСС):

*Staphylococcus aureus* АТСС 25923 (золотистый стафилококк, антибиотикочувствительный, бактерия грамположительная);

*Escherichia coli* АТСС 25922 (кишечная палочка, антибиотикочувствительная, бактерия грамотрицательная).

Для проведения тестирования была использована известная коммерчески доступная агаризованная среда Мюллера-Хинтона (HiMedia, India). Питательную среду готовили согласно инструкции, автоклавировали при температуре 120 °С в течение 30 мин. Затем при остывании в стерильных условиях ламинар-бокса среду разливали слоем толщиной 4 мм по чашкам Петри с диаметром 100 мм. Чашки оставляли при комнатной температуре для застывания и сразу использовали.

Затем приготавливали инокулюм из агаровой культуры и проводили посев. Оптическая плотность бактериальной суспензии с концентрацией  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл при визуальном контроле соответствовала стандарту мутности 0,5 по Мак-Фарланду [13].

Стандартный инокулюм в количестве 1-2 мл наносили пипеткой на поверхность чашки Петри с питательной средой, равномерно распределяли по поверхности покачиванием, после чего удаляли избыток инокулюма пипеткой. Приоткрытые чашки подсушивали при комнатной температуре в течение 10-15 мин.

Не позднее чем через 15 мин после инокуляции на поверхность питательной среды с помощью стерильного пинцета помещали образцы исследуемых материалов в форме дисков диаметром 5 мм. Расстояние от середины диска до края чашки и между дисками составляло не менее 15-20 мм. Чтобы диски равномерно контактировали с поверхностью агара, их аккуратно прижимали пинцетом. Непосредственно после аппликации дисков чашки Петри помещали в термостат кверху дном и инкубировали при температуре 35 °С в течение 18-24 ч.

# ВУ 23817 С1 2022.10.30

После окончания инкубации образец обрабатывали в коронном разряде и производили учет результатов. Диаметр зон задержки роста измеряли с точностью до 1 мм при помощи штангенциркуля, а также отмечали интенсивность роста микроорганизмов под диском.

В таблице приведены результаты изучения антимикробной активности образцов прототипа и предлагаемой гидрофильной композиции на основе ПВС на двух тест-штаммах в сопоставимых условиях. Как видно из данных таблицы, тест-штаммы отличаются по своей чувствительности. Более чувствительным оказался *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Зоны отсутствия роста золотистого стафилококка составили от 15 мм при оценке прототипа до 39 мм - при оценке криогелевой композиции в электрретном состоянии. Для кишечной палочки зоны отсутствия роста микроорганизма составили от 21 до 32 мм соответственно. Таким образом, заявляемая композиция превосходит прототип по антибактериальной активности в отношении как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий. Одним из важных факторов этой активности может служить электрретное состояние композиции с оптимальными значениями эффективной поверхностной плотности заряда  $\sigma_{эф}$  до 10 нКл/см<sup>2</sup> и более.

## Антибактериальная активность композиции и прототипа относительно грамположительных и грамотрицательных бактерий

№ варианта	Исследуемый материал	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	
		диаметр зоны отсутствия роста*, мм	интенсивность роста под материалом**	диаметр зоны отсутствия роста*, мм	интенсивность роста под материалом**
1	Композиция на основе ПВС	21	отсутствие роста	27	отсутствие роста
2	Композиция на основе ПВС (в электрретном состоянии)	32	отсутствие роста	39	отсутствие роста
3	Прототип	13	слабый рост	15	слабый рост

Примечания:

\*средний результат измерений;

\*\*шкала роста интенсивности под диском (материалом).

Проведенный анализ уровня техники позволил установить, что аналоги, характеризующиеся совокупностью признаков, тождественной всем признакам заявляемой композиции для получения бактерицидного криогеля, отсутствуют. Признак, отличительный от прототипа заявляемого изобретения, а именно "композиция выполнена в виде криогеля, находящегося в электрретном состоянии", не выявлен, несмотря на то что применение входящих в композицию веществ известно в антибактериальных композициях. Заявленный технический результат достигается всей совокупностью существенных признаков и не является суммой положительных результатов, зависящих от свойств каждого отдельного компонента композиции. Следовательно, заявляемая композиция соответствует условиям патентоспособности "изобретательский уровень" и "новизна".

Композицию можно использовать в составе аппликационного материала при лечении трофических язв различной этиологии, хирургических ран, ожогов.

Заявляемая композиция для получения бактерицидного криогеля является промышленно применимой, т. к. для ее реализации используются выпускаемые промышленностью компоненты, технические средства и стандартные лабораторные операции химии полимеров, аналитической химии и биотехнологии.

# BY 23817 C1 2022.10.30

Источники информации:

1. RU 2254145, 2005.
2. МАЕВ И.В. и др. Витамины. Москва: МЕДпресс-информ, 2011, 544 с.
3. RU 2328313, 2008.
4. RU 2422133, 2011 (прототип).
5. УХАРЦЕВА И.Ю. и др. Свойства наполненных гелей на основе поливинилового спирта. Сб. трудов межд. научно-техн. конф. "Поликом-98". Гомель, 1998, с. 195-198.
6. ХОРН Х. и др. Лекарства из улья: мед, пыльца, маточное молочко, пчелиный воск, прополис, пчелиный яд. Москва: АСТ, Астрель, 2006, 238 с.
7. МАЕВ И.В. и др. Витамины. Москва: МЕДпресс-информ, 2011, 544 с.
8. ЛОЗИНСКИЙ В.И. Криотропное гелеобразование растворов поливинилового спирта. Успехи химии, 1998, № 67 (7), с. 641-655.
9. МАКАРЕВИЧ А. В. и др. Электрические поля и электроактивные материалы в биотехнологии и медицине. Гомель: ИММС НАНБ, 1998, 106 с.
10. BY 15555, 2012.
11. ЛУЩЕЙКИН Г.А. Методы исследования электрических свойств полимерных материалов. Москва: Химия, 1988, 157 с.
12. Методика испытаний прочности гелеобразных продуктов № 004-2010, ГНУ "Институт механики металлополимерных систем имени В.А. Белого Национальной академии наук Беларуси". Гомель, 2010, 4 с.
13. Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания МУК 4.12.1890-04. Москва: Минздрав России, 2004, 71 с.