

Теоретическая основа способа измерения прямой мышечной возбудимости (экспериментальное исследование)

В. И. Бабинков, В. Н. Яковенко

Контактное лицо: Виктор Иванович Бабинков, vbabinkov@mail.ru

В экспериментах *in vivo* при помощи атравматического игольчатого электрода для прямой миостимуляции и регистрации импедансограммы мышечных сокращений проводили сравнение амплитуды и формы механограмм вызванных сокращений (МГС) с изменениями импедансограмм сокращений мышц (ИГС). При пороговых (локальных) и максимальных ИГС было зарегистрировано снижение импеданса. Абсолютные значения амплитуды МГС и ИГС изменяли пропорционально, однако конфигурации МГС и ИГС отличались. Началу «механического» ответа предшествовал потенциал действия и локальное сокращение мышцы. Результаты исследования показали, что параметры ИГС пропорциональны количеству открытых ионных каналов Ca^{2+} и могут быть использованы для оценки степени поражения мышечной ткани, исходя из изменения параметров прямой мышечной возбудимости (ПМВ).

Ключевые слова: контактная кондуктометрия, прямая мышечная возбудимость, стимуляционная импедансная миография, потенциалчувствительные Ca^{2+} -каналы, исследование поражения мышечной ткани.

Для цитирования: Бабинков В. И., Яковенко В. Н. Теоретическая основа способа измерения прямой мышечной возбудимости (экспериментальное исследование). Раны и раневые инфекции. Журнал им. проф. Б. М. Костюченка. 2017; 4(2): 12–17.

DOI: DOI: 10.25199/2408-9613-2017-4-2-12–17

Theoretical basis of the method for measuring direct muscular excitability (experimental research)

V. I. Babinkov, V. N. Yakovenko

During “*in vivo experiments*” there was compared the amplitude and shape of induced contractions mechanograms (MGS) with changes in muscle contractions impedanceograms (IGS). It was made with the help of an atraumatic needle electrode for direct myostimulation and registration of muscle contraction impedance. So the impedance decrease was registered at threshold (local) and maximum IGS. The absolute amplitude values of MGS and IGS were changed proportionally, however, the configuration of the MGS and IGS were different. In a way the action potential and local muscle contraction were preceded the beginning of the “mechanical” response. According to the results of the study, the IGS parameters are proportional to the number of open ion channels Ca^{2+} and can be used to assess the degree of muscle tissue damage based on changes in the parameters of direct muscle excitability (PMV).

Key words: contact conductometry, direct muscle excitability, stimulating impedance myography, the potential sensitive Ca^{2+} channels, the study of muscle tissue damage.

For citation: Babinkov V. I., Yakovenko V. N. Theoretical basis of the method for measuring direct muscular excitability (experimental research). Wounds and Wound Infections. The Prof. B. M. Kostyuchenok Journal. 2017; 4(2); 12–17.

Введение

Увеличение числа пациентов с такими проблемами, как, например, сосудистые осложнения сахарного диабета или травмы вследствие экологических или промышленных катастроф, диктует необходимость в наглядных способах функциональной диагностики и малогабаритных приборах, показывающих степень повреждения мышечной ткани и уровень ее энергетического обмена независимо от сохранности нервно-синаптических путей. В качестве таких доступных средств может быть предложен метод стимуляционной импедансной миографии (СИМ), позволяющий посредством игольчатого мини-электрода вызывать сокращение мышцы путем прямой стимуляции и

тем же электродом регистрировать импедансограмму сокращений (ИГС). Помещая игольчатый электрод в мышцы основных отделов конечности по определенной схеме, можно судить о ее жизнеспособности по суммарным количественным показателям прямой мышечной возбудимости (ПМВ) [1, 2, 3, 4].

Способность к сокращению является главным показателем состояния мышечной ткани. Особая роль в этом процессе принадлежит ионам кальция, которые специфически инициируют сокращение. Роль Ca^{2+} в механизме вызванного сокращения и в процессе его визуализации по методике СИМ изучена недостаточно. Игольчатую импедансографию можно рассматривать как частный случай контактной

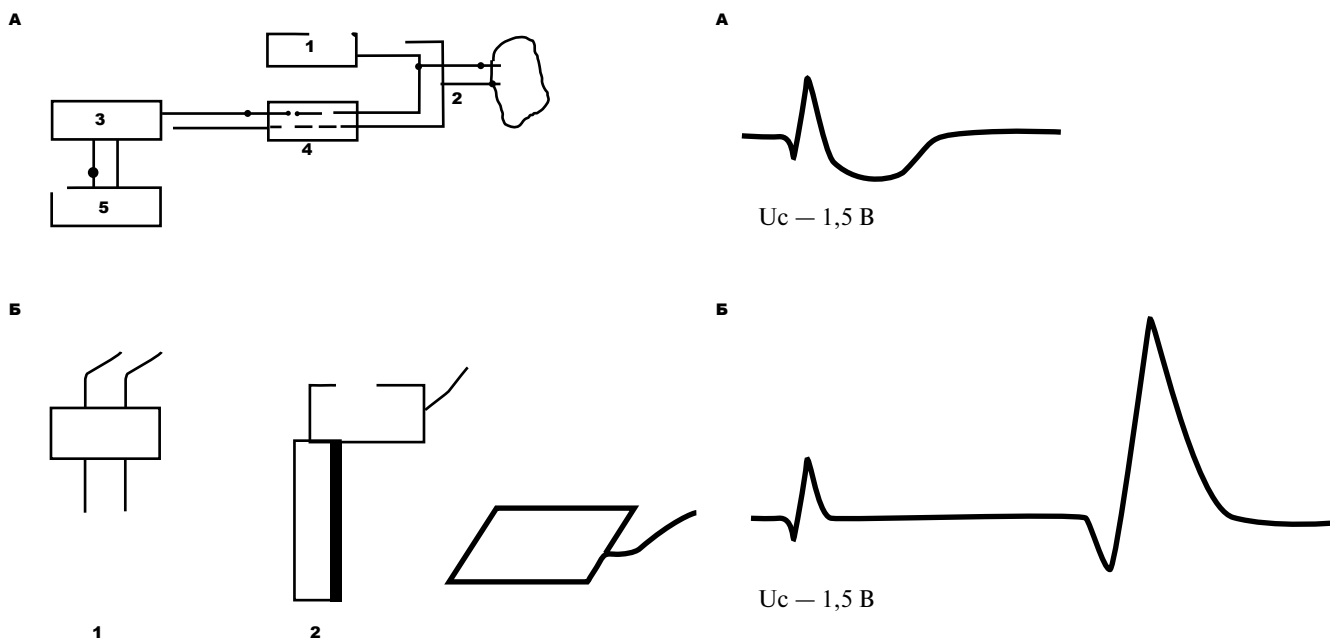


Рис. 1. Измерительная установка и ответные реакции стимуляционной импедансной миографии. Слева: а) блок-схема измерительной установки: (1 — электростимулятор, 2 — электроды, 3 — высокочастотный омметр, 4 — низкочастотный фильтр, 5 — регистратор); б) конструкции электродов. Справа: А - ответная сократительная реакция нормальной мышцы (снижение импеданса); Б - отсутствие сократительной реакции ишемизированной мышцы при 10-кратном увеличении стимула, поляризация электрода проявляется увеличением импеданса

Fig. 1. Measuring device and responses of stimulating impedance myography. On the left: а) a block diagram of the measurement device: 1. Electrical stimulator, 2. Electrodes, 3. High-frequency ohmmeter, 4. Low-frequency filter, 5. Recorder б) electrode design. On the right: А - response contraction of normal muscle (decrease in impedance), В - the absence of contractile response of ischemic muscle with a 10-fold increase in stimulus, the polarization of the electrode is manifested by an increase in impedance

кондуктометрии — метода исследования ионного состава растворов и ионной проводимости. Это дает возможность изучать ионные механизмы проводимости, в частности, роль Ca^{2+} при формировании импедансограммы (ИГ) вызванного сокращения с точки зрения кондуктометрии, что и явилось целью исследования.

Задачи исследования

1. Сопоставить параметры МГС и ИГС при увеличении амплитуды стимулирующего тока.
2. Изучить этапы формирования ИГС ответных реакций, начиная с пороговых локальных сокращений, до максимальных реакций.
3. Проанализировать работу системы «прибор — мышца».

Материалы и методы

Работа выполнена на базах Первого Московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова и Института хирургии им. А. В. Вишневского.

Экспериментальная измерительная установка и принцип ее работы. Для регистрации импеданса

использовали мостовую схему измерения на частотах 2 кГц и 120 кГц, электрический стимулятор ЭСУ-2, позволяющий генерировать прямоугольные стимулирующие импульсы 0,01 мс и 1,0 мс с частотой 1 Гц, а также работать в ручном режиме (рис. 1).

Принцип работы экспериментальной установки (рис. 1). Возбуждающие импульсы регулируемой длительности и амплитуды из блока (1) через электроды (2) поступают в мышечную ткань и вызывают ее сокращение. На эти же электроды подается измерительный ток 2 кГц или 120 кГц (в зависимости от схемы установки). Сокращение модулирует измерительный ток по амплитуде в зависимости от величины межэлектродного сопротивления. Игольчатый электрод из нержавеющей стали покрыт изолирующим лаком за исключением конечной части длиной 5 мм (через нее поступает возбуждающий импульс постоянного тока и отводится электрический сигнал от мышцы), и имеет диаметр 0,3 мм.

Были апробированы две конструкции электродов (рис. 1-б). В первой из них два игольчатых электрода впрессованы в один пластмассовый держатель на расстоянии 8–10 мм друг от друга. Во второй конструкции один из игольчатых электродов заменен на

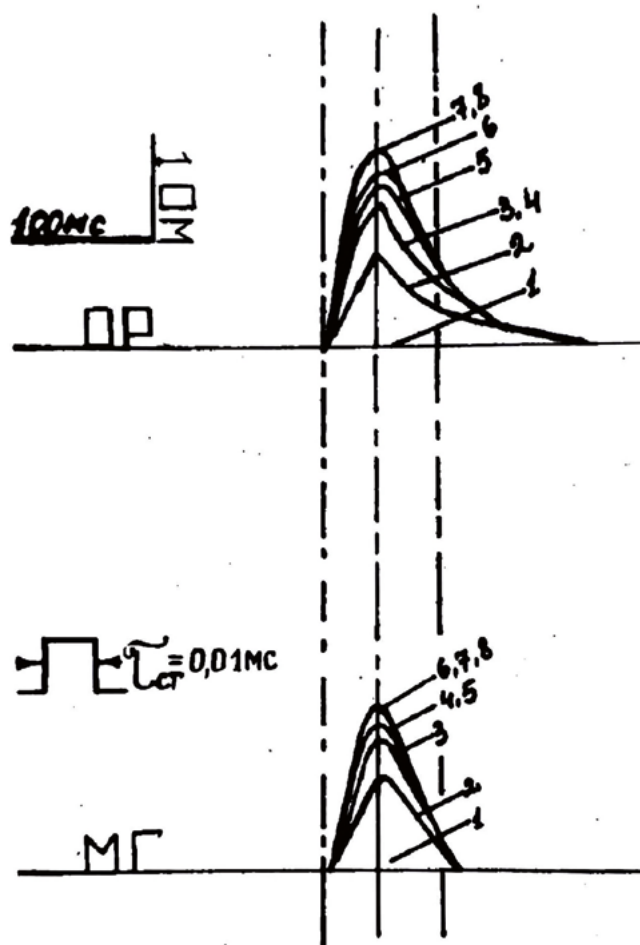


Рис. 2. Синхронная регистрация ответных сократительных реакций (ОП) и механограмм (МГ) сокращений. Цифры справа — номера сократительных реакций. Пояснения в тексте
Fig. 2. Synchronous registration of response contractions and mechanograms of contractions. The numbers on the right are the numbers of contractions. Explanations in the text

пластинчатый макроэлектрод из нержавеющей стали размером 30 × 50 мм. Такая конструкция позволяет менять расположение игольчатого электрода на конечности животного. Для стерилизации электродов использовался метод кипячения, после чего их хранили в 96% этиловом спирте.

Методики экспериментов на животных. Опыты проводили на кроликах обоего пола весом 2,0–2,5 кг. Животных фиксировали спинкой вверх на специальном столике. Перед исследованием каудальную конечность кролика коротко стригли и в области выше скакательного сустава с помощью резинового жгута через марлевую прокладку, смоченную 0,9% NaCl, фиксировали накожный пластинчатый электрод. Использовали готовый пластинчатый электрод из нержавеющей стали для электрокардиографии.

При комнатной температуре исследовали головки икроножной мышцы, погружая электрод в брюшко мышцы поперек направления волокон. Межелектродное расстояние составляло 5–8 см. Регистрацию электрических сигналов осуществляли либо на бумажном носителе при скорости от 5 мм/с до 200 мм/с, либо фотографировали с экрана осциллоскопа электромиографа на фотопленку при скорости 1 мм/мс. Для этого применяли электромиограф «Медикор» (Венгрия) и перьевой регистратор НЕК-6 (ГДР) с записью на тепловой бумаге.

Для обезболивания в расчетной дозировке применяли препарат «Реланиум». Полученные результаты носили качественный (феноменологический) характер, при статистической обработке использовали метод χ^2 — квадрат для малых выборок. Результаты считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Сопоставление МГ и ИГ ответных реакций. При регистрации МГС использовали пьезоэлектрический датчик из комплекта к регистратору НЕК-6 (ГДР). Регистрацию МГ проводили через кожу в участке видимых невооруженным глазом сокращений, возникших под игольчатым электродом. В этой области на коже фиксировали пьезодатчик, сигналы с которого записывали на одном из каналов регистратора, параллельно исследовали ИГС и регистрировали на другом канале. Один из опытов такого сопоставления представлен на рис. 2.

Следует пояснить, что ИГС на реальных записях направлены вниз и расположены ниже изолинии (базового сопротивления), т. к. сокращение сопровождается снижением импеданса. Факт снижения импеданса (а не повышения!) был проверен путем параллельного подключения межэлектродных сопротивлений, снижавших импеданс. Одинаковая направленность изменений во время ИГС и возникающего отклонения базового импеданса после шунтирования электродов указывала на снижение импеданса при сокращении. На рис. 2 в целях наглядности приведены сопоставления МГС и ИГС. Величина ИГС, выраженная в единицах импеданса, представлена в абсолютных значениях с положительным знаком. Кроме того, представлены линии изохронии, позволяющие сопоставить ИГС и МГС по времени развития процесса. Для этого кривые реальных ответов были соотнесены по точкам максимально достигаемых ИГС и МГС. Согласно физиологическим исследованиям в точке максимума сокращения наблюдается наибольшее растяжение упругого связочного аппарата мышцы, чем устраняется его влияние на сокращение [5].

Формирование ответной реакции на импедансограмме от пороговых значений до максимально достигаемых величин было изучено в опытах, где при высокой скорости развертки на одном фотокадре наблюдали появление порогового потенциала действия (ПД) и

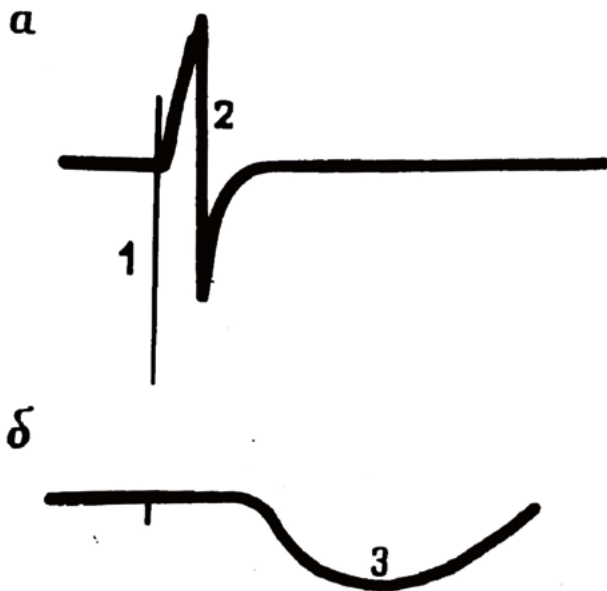


Рис. 3. Параллельная регистрация потенциала действия (ПД) мышцы и порогового (локального) ответа. Фото с экрана электромиографа. а) ПД мышцы: 1 — артефакт стимула (0,01 мс), 2 — двухфазный потенциал; б) ИГС порогового (локального) ответа. Пояснения в тексте
Fig. 3. Parallel registration of muscle action potential and threshold (local) response. Photo from the electromyograph screen. а) the muscle action potential: 1 Stimulus artifact (0.01 ms), 2. Biphasic potential, б) impedanceograms of muscle contractions in the threshold (local) response. Explanations in the text

ИГС. Биполярный игольчатый ЭМГ-электрод погружали в сокращающийся участок мышцы рядом с мини-электродом устройства. Сигналы подавали на 2 канала электромиографа и фотографировали. Таким способом удавалось регистрировать одновременно пороговые ПД мышцы и минимальные (локальные) сокращения мышечных волокон (рис. 3).

Пороговые локальные сокращения вместе с максимальными ИГС, возникавшие при увеличении стимулов, можно было рассмотреть только при медленной скорости развертки и небольшом усилении (рис. 4)

Результаты исследования и обсуждение

Кривые МГС и ИГС абсолютных величин реакции на возрастающие импульсы тока на импедансограммах вызванных сокращений, записанные одновременно на 2 каналах регистратора, представлены на рис. 2. Сравнение выявляет синхронное, но разнонаправленное отклонение амплитудных значений МГС и ИГС на растущие импульсы при параллельной регистрации процессов. Поскольку кондуктометрия измеряет проводимость для ионов, в том числе Ca^{2+} , который инициирует сокращение, то это убедительно свидетельствует о том, что ионные потоки пропорциональны

количеству открытых ионных каналов и работающих актомиозиновых мостиков. Но вместе с тем нельзя не обратить внимания на разные формы кривых, разное время их начала и окончания. Кривые МГС представляют собой равнобедренные треугольники, а кривые ИГС начинаются раньше и отличаются большой крутизной в начале сокращения. Линии спада ИГС имеют пологий вид и по длительности значительно превышают аналогичные линии МГС. Приведенные описания вполне согласуются с литературными данными о том, что процесс активации и изменение проводимости, в частности, проведения ионов Ca^{2+} , возникают раньше мышечного сокращения [5]. Несоответствие времени окончания записей МГС и ИГС может быть связано с перемещением ионов и восстановлением жидкостного баланса ткани после сокращения. Таким образом, несоответствие формы МГС и ИГС объясняется тем, что они отображают процесс сокращения с разных сторон: изменение конфигурации мышцы, отображаемое МГС, и проводимость для ионов, регистрируемая на ИГС, вполне могут не совпадать.

Электрические процессы, предшествующие появлению МГС, представлены на рис 3: ИГС (ОР) (внизу) и ЭМГ (вверху). На ЭМГ виден стимулирующий импульс (1) и двухфазный потенциал действия мышцы (а), вызванный одиночным стимулом 0,01 мс. На ИГС (б) видна полуволна снижения импеданса (3). Она возникает сразу за потенциалом действия, при значениях стимулирующего тока, близких к пороговым, имеет протяженность 15–20 мс (ПД мышцы равен 2–3 мс) и незначительную амплитуду. При увеличении напряжения стимулирующего тока эта полуволна закрывается взрывным ответом, сопровождающим возникшую МГ сокращения. Полуволна, регистрируемая до появления МГС в ответ на пороговый импульс, является местной сократительной реакцией. Локальные ответы (пороговые сокращения мышечных волокон) можно рассмотреть на ИГС (рис. 4), зарегистрированной с помощью последней модификации прибора при плавном ручном подборе стимулирующего тока (показано стрелкой на нижней записи) [4]. При увеличении стимула локальные реакции перерастают в развернутые высокоамплитудные ИГС. Переход в интактной мышце имеет взрывной характер, связанный, вероятно, с вовлечением целой группы мышечных волокон. Пороговые (локальные) и максимальные ИГС могут возникать в отсутствие иннервации и таким образом характеризуют прямую мышечную возбудимость (ПМВ).

Анализ системы «прибор — мышца». Схема устройства для импедансографии, представленная на рис. 1, и контакт электродов с проводящей средой дают возможность рассматривать результаты с точки зрения закономерностей контактной кондуктометрии. Это важно отметить, во-первых, потому что существующие

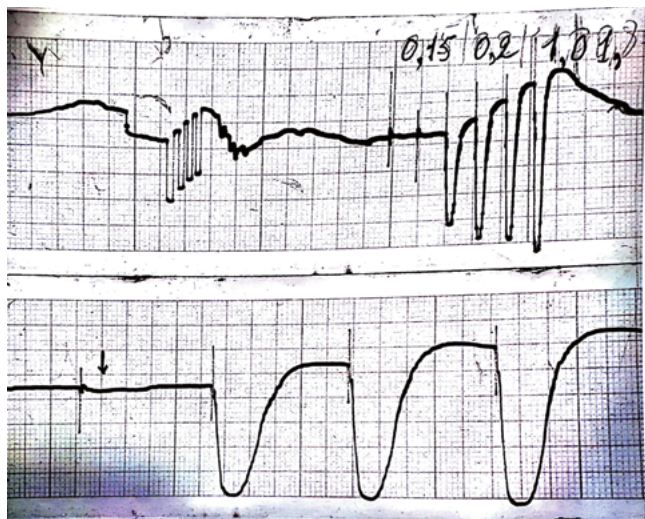


Рис. 4. Пороговые (локальные) ОР и максимальные ОР в ответ на возрастающие импульсы тока. На верхней записи: калибровочные импульсы 1 Ом, пороговые ответы на ток 0,15 мА при плавном увеличении стимула и максимальные ответы при скорости регистрации 5 и 25 мм/с. Стрелка на нижней записи — пороговое (локальное) сокращение
Fig. 4. Threshold (local) responses and maximum responses in reaction to increasing current pulses. On the top: calibration pulses 1 Ohm, threshold responses to a current of 0.15 mA with a smooth stimulus increase and maximum responses at a recording rate of 5 and 25 mm/s. The arrow on the bottom entry is a threshold (local) reduction

методы функционального исследования мышц не могут реализоваться без участия нервно-синаптических механизмов возбуждения, которые обычно повреждаются при патологии мышц. Прямая мышечная возбудимость свободна от этого ограничения. Во-вторых, метод отображает энергозависимую работу Ca^{2+} -насоса: фазу выброса и фазу обратного захвата кальция, раскрытие и закрытие ионных каналов, поэтому может указывать на степень энергетического дефицита. Выравнивание трансмембранного градиента ионов равносильно гибели мышечного волокна.

Весь комплекс регистрируемых электродами сигналов представляет два процесса. Первый из них включает создание потенциала поляризации молекулярного конденсатора игольчатого электрода, образованного двойным электрическим слоем вместе с электризованными тканями, и процесс их деполяризации. Второй процесс совпадает с активной реакцией мышцы — возбуждением и сокращением. Поляризация происходит под влиянием напряжения стимулирующего импульса, подаваемого на игольчатый электрод, и сопровождается увеличением сопротивления для измерительного тока. Кривая падения потенциала поляризуемого электрода после окончания тока стимула снижается, приближаясь к изолинии. На рис. 1 видно, что картина снижения потенциала мини-электрода,

близкая к типичной кривой деполяризации, наблюдается только в мышце, подвергавшейся ишемии в течение 6 ч, в то время как референтная мышца отреагировала сокращением. Очевидно, потенциал стимулирующего импульса, вызвавший поляризацию электрода и тканей и последующую деполяризацию, является начальной движущей силой этих процессов.

Упомянутый второй регистрируемый процесс отображает дальнейшее снижение импеданса ниже изолинии во время сокращения, он виден в интактной мышце на рис. 1. Его кривая является продолжением кривой деполяризации электрода. Второй процесс, вероятно, участвует в деполяризации электрода. Как показано на рис. 2, кривая совпадает по времени с сокращением мышцы. Этот факт согласуется с тем, что во время активации и сокращения мышцы открываются ионные каналы, возникает перемещение ионов, регистрирующееся в виде снижения импеданса [6, 7, 8]. Движущей силой перемещения является концентрационный градиент Ca^{2+} на мембране саркоплазматического ретикула, создаваемый Ca^{2+} -насосом. Процесс перемещения ионов возникает после активации потенциалчувствительных белковых молекул мембран, вызывающих конформационные перестройки каналов, пропускающих ионы. Проницаемость мембран для определенного вида ионов определяется количеством открытых каналов (зависит от объема мышцы, активированного стимулирующим импульсом) и их размерами [6].

При активации и сокращении мышцы увеличивается проницаемость всех ионных каналов; катионы и анионы, свойства которых влияют на электропроводность растворов (скорость, активность и др.), находятся в ионизированной форме [6, 7, 8]. Но совпадение формы и амплитуды импедансограммы с механограммой сокращения, а также ответные локальные сокращения, предшествующие МГС, доказывают роль ионизированного кальция в увеличении проводимости мышцы при формировании ИГС, поскольку только кальций может инициировать сокращение.

Кондуктометрия является специфическим методом измерения ионного состава и перемещения ионов. В литературе указывается недостаточная точность метода для количественного анализа содержания ионов, в частности, из-за поляризационных помех [9]. Но для оценки жизнеспособности мышечной ткани это не имеет решающего значения по сравнению с теми плюсами, которые дает метод. В частности — это возможность определения прямой мышечной возбудимости для уточняющей диагностики. Тем более что на возможные способы устранения поляризационных помех и специализации приборов к виду исследуемого материала указывают достижения техники физико-химических

исследований [9, 10]. СИМ не имеет аналогов в медицинской практике. Она принципиально отличается от неконтактного метода импедансографии, предлагаемого для диагностики неврологических заболеваний [11, 12]. СИМ также показала хорошие результаты в клинических испытаниях при хирургической патологии [13, 14].

Заключения

1. Пропорциональность в увеличении абсолютных величин амплитуды вызванных сокращений МГС и ИГС объясняется количественной зависимостью между развитием мышечной тяги, количеством открытых ионных каналов и трансмембранным перемещением Ca^{2+} .

2. Различия направленности отклонений и конфигурации МГС и ИГС связаны с тем, что импедансография и механография отражают разные процессы,

лежащие в основе сокращения (ионные перемещения и механическая тяга).

3. Начало ИГС опережает начало МГС. В период, предшествующий механограмме, возникают пороговый потенциал действия и локальное сокращение мышцы.

4. Пороговое локальное сокращение и изменения сократительной реакции на возрастающие стимулы характеризуют ПМВ.

5. Вызванные сокращения мышц, регистрируемые контактной кондуктометрией, сопровождаются снижением импеданса, совпадающим с открытием ионных каналов и перемещениями Ca^{2+} .

6. СИМ отображает энергозависимые процессы мышечного сокращения и поэтому может быть использована для оценки степени поражения мышечной ткани, в том числе при механической травме и ишемии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Кузин М. И., Бабинков В. И. Оценка повреждения мышц конечности при экспериментальном СДР у кролика с помощью метода прямой мышечной возбудимости. Актуальные вопросы военной травматологии. 1979; 7: 7–12. [Kuzin M. I., Babinkov V. I. Evaluation of limb muscle damage in rabbit's experimental long-term crush syndrome through the method of direct muscle excitability. Topical issues of military traumatology = Aktual'ny'e voprosy voennoj travmatologii 1979; 7: 7–12. (In Russ.)].
- Кузин М. И., Бабинков В. И., Светухин А. М. и др. Способ определения некроза тканей скелетных мышц. А.С. № 1113088. Приоритет от 15.07.1981. [Kuzin M. I., Babinkov V. I., Svetukhin A. M. et al. Method for determining necrosis of skeletal muscle tissues." A. S. № 1113088. The priority of 15.07.1981. (In Russ.)].
- Бабинков В. И. Способ определения поражения мышечной ткани голени и стопы. Положительное решение по заявке 5000/46(063854). Приоритет от 19.07.91. [Babinkov V. I. Method for determining the lesion of muscle tissue of the leg and foot. A positive decision on the application 5000/46(063854). The priority of 19.07.91. (In Russ.)].
- Бабинков В. И., Зюзин А. С. Прибор для диагностики степени поражения мышечной ткани голени и стопы. Российский генеральный регистр. Код: 1967.61A61HT. 1993. Сертификат изобретения. [Babinkov V. I., Zyuzin A. S. Device for diagnosing the degree of damage to the muscular tissue of the lower leg and the foot. Russian General Register, Code: 1967.61A61HT. 1993. Certificate of invention. (In Russ.)].
- Жуков Е. К. Очерки по нервно-мышечной физиологии. Л.: Наука, 1969. [Zhukov E. K. Essays on neuromuscular physiology. Leningrad: Nauka, 1969. (In Russ.)].
- Камкин А. Г., И. С. Киселева. Физиология и молекулярная биология мембран клеток. М.: Академия, 2008. [Kamkin A. G., Kiseleva I. S. Physiology and molecular biology of cell membranes. Moscow: Academy, 2008. (In Russ.)].
- Urry D. W. A Molecular Theory of Ion-Conducting Channels; Field-Dependent Transition between Conducting and Nonconducting Conformations. Proc. Nat. Academe. Sci. USA, 69, 1610 (1972).
- Физическая и коллоидная химия. Лабораторный практикум. Под ред. С. Л. Белопухова. М.: Проспект, 2016. [Physical and colloidal chemistry. Laboratory workshop. Ed. by Belopuhov S. L. Moscow: Prospect, 2016. (In Russ.)].
- Андреев В. С. Кондуктометрические методы и приборы в биологии и медицине. М.: Медицина, 1973. [Andreev V. S. Conductometric methods and devices in biology and medicine. Moscow: Medicine, 1973. (In Russ.)].
- Ремпель А. А., Валева А. А. Материалы и методы нанотехнологий. Екатеринбург, 2015. 136 с. [Rempel A. A., Valeeva A. A. Materials and methods of nanotechnologies. Ekaterinburg, 2015. 136 p. (In Russ.)].
- Roth B. L. The Electrical Conductivity of Tissue. The Biomedical Engineering Handbook. Second Edition Ed. Joseph D. Bronzino Boca Raton CRC Press, LC, 2000.
- Sanchez B. et al. Guidelines to electrode positioning for human and animal electrical impedance myography research.
- Бабинков В. И., Федоров Э. З., Саруханян О. О. Диагностика повреждения мышц при синдроме длительного раздавливания методом импедансографии скелетных мышц (ИГСМ). Синдром длительного раздавливания. М.: Воениздат, 1998. С. 110–112. [Babinkov V. I., Fedorov E. Z., Sarukhanyan O. O. Diagnosis of muscle damage in the syndrome of prolonged crushing by the method of skeletal muscle impedance (IGSM). Long-term crush syndrome. Moscow: Voenizdat, 1998. P. 110–112. (In Russ.)].
- Гостищев В. К., Муляев Л. Ф., Бабинков В. И. и др. Стимуляционная импедансная миография — объективный метод диагностики жизнеспособности мышц у больных сахарным диабетом. Раны и раневые инфекции. Тезисы докладов Международного симпозиума. М., 1993. С. 333–334. [Gostishchev V. K., Mulyaev L. F., Babinkov V. I., and others. Stimulation impedance myography is as an objective method for diagnosing the viability of muscles in patients with diabetes mellitus. Wounds and wound infections. Abstracts of the International Symposium. Moscow, 1993. P. 333–334. (In Russ.)].