

И.И.Д.9

ISSN 0206-4952



И.И. Мечников

ИММУНОЛОГИЯ

Том 30

5

Издательство "Медицина"

2009

Результаты изучения способности фенотропила корректировать вызванные циклофосфамидом нарушения неспецифического звена иммунитета представлены на рис. 1, *в, г*. Фенотропил устраняет ингибирующее действие иммунодепрессанта. Установлено статистически достоверное повышение фагоцитарного индекса (более чем на 20%) при применении фенотропила в дозе 50 мг/кг ($p_2 < 0,05$) и 100 мг/кг ($p_2 < 0,001$) и фагоцитарного числа (более чем на 15%) при назначении в дозе 25 мг/кг ($p_2 < 0,05$) и 100 мг/кг ($p_2 < 0,05$) по сравнению с аналогичными показателями в контроле № 2. При использовании фенотропила в дозе 100 мг/кг параметры, отражающие фагоцитарную активность нейтрофилов, близки к значениям нормы в контроле № 1.

Под влиянием фенотропила при пероральном введении в течение 2 нед на фоне формирования иммунологической недостаточности полностью восстанавливаются клеточная и гуморальная реакции иммунного ответа на ЭБ ($p_2 < 0,05$): ИР и уровень титра антител достигают соответствующих значений в группе животных, получавших эквивалентный объем физраствора (контроль № 1) ($p_1 > 0,05$) (рис. 2, *а, б*). Фенотропил при курсовом пероральном применении также уменьшает ингибирующее влияние циклофосфамида на фагоцитарную активность нейтрофилов: % фагоцитоза ($p_2 < 0,05$) и фагоцитарное число ($p_2 < 0,05$), не только достигая показателей, отражающих напряженность неспецифического звена иммунитета, в контрольной группе № 1, но и превышая ($p_1 < 0,05$) (рис. 2, *в, г*).

Таким образом, полученные данные позволяют сделать следующие выводы: 1) фенотропил проявляет выраженное иммунокорректирующее действие, ликвидируя циклофосфамидиндуцированные

иммунные нарушения; 2) фенотропил при внутрибрюшинном (в дозах 25 и 50 мг/кг) и при 2-недельном (в дозе 50 мг/кг) введении оказывает выраженное воздействие лишь на специфическое звено иммунного ответа, тогда как внутрибрюшинное применение препарата в дозе 100 мг/кг способствует восстановлению иммунологической реактивности в целом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александровский Ю. А., Чехонин В. П. Клиническая иммунология пограничных психических расстройств. — М., 2005.
2. Ахапкина В. И., Воронина Т. А. Спектр фармакологических эффектов фенотропила // Фарматека. — 2005. — № 13. — С. 19—25.
3. Белоусов Ю. Б., Мухина М. А. Фенотропил — ноотропный препарат нового поколения // Качеств. практика. — 2005. — № 3. — С. 1—12.
4. Бельская Г. Н., Деревянных Е. А., Макарова Л. Д. и др. Опыт применения фенотропила при лечении больных в остром периоде инфаркта головного мозга // Атмосфера. Невр. бол. — 2005. — № 1. — С. 25—28.
5. Ветлугина Т. П., Семке В. Я. Клиническая психонейроиммунология на современном этапе // Сиб. вестн. психиатр. и наркол. — 2003. — № 1. — С. 34—36.
6. Герасимова М. М., Чичановская А. В., Слезкина А. А. Клинико-иммунологические аспекты влияния фенотропила на последствия церебрального инсульта // Журн. неврол. и психиатр. — 2005. — № 5. — С. 63—64.
7. Хаитов Р. М., Гушин И. С., Пинегин Б. В. и др. Методические указания по изучению иммунотропной активности фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному доклиническому изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р. У. Хабриева. — М., 2005. — С. 501—514.
8. Alves G. J., Palermo-Neto J. Neuroimmunomodulation: the cross-talk between nervous and immune systems // Rev. Bras. Psiquiatr. — 2007. — Vol. 29, N 4. — P. 363—369.
9. Irwin M. R. Human psychoneuroimmunology: 20 years of discovery // Brain Behav. Immun. — 2008. — Vol. 22, N 2. — P. 129—139.

Поступила 20.04.09

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ АЛЛЕРГОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2009

УДК 615.276.2/4.03:616.248-056.43].015.4

С. В. Гурьянова, И. Г. Козлов, Е. А. Мещерякова, Л. Г. Алексеева,
Т. М. Андропова

ГЛЮКОЗАМИНИЛМУРАМИЛДИПЕПТИД НОРМАЛИЗУЕТ БАЛАНС ТН1/ТН2 ПРИ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва,
117997, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, ГОУ ВПО Российский государственный медицинский
университет Росздрава, Москва

С учетом современных представлений о патогенезе атопической бронхиальной астмы (АБА), одним из ключевых моментов которого является гиперактивация Т-хелперов 2-го типа (Th2) на фоне снижения активности Т-хелперов 1-го типа (Th1), значительный практический интерес представляет поиск лекарственных препаратов, нормализующих баланс Th1/Th2. В работе показано, что глюкозаминил-мурамилдипептид (ГМДП), действующее вещество иммуномодулятора — липопид, *in vitro* модулирует пролиферацию ФГА- и анти-CD3-стимулированных мононуклеарных клеток здоровых доноров и больных АБА, а также дозозависимо увеличивает продукцию ими интерферона- γ (в 3—8 раз). При этом как интактные, так и митогенстимулированные мононуклеары больных АБА существенно снижали секрецию интерлейкина-4 в присутствии исследуемых концентраций ГМДП. Таким образом, обнаруженное в предыдущих клинических исследованиях положительное влияние липоида (ГМДП) на состояние больных АБА обусловлено воздействием на патогенетический механизм аллергического воспаления, в частности, путем нормализации баланса Th1/Th2.

Ключевые слова: липопид, ГМДП, цитокины, атопическая бронхиальная астма, баланс Th1/Th2

S.V. Guryanova, I.G. Kozlov, E.A. Meshcheryakova, L.G. Alekseeva, T.M. Andronova.

INVESTIGATION INTO THE INFLUENCE OF GLUCOSAMINYLMURAMYL DIPEPTIDE ON THE NORMALIZATION OF 'h1/Th2 BALANCE IN PATIENTS WITH ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA

The search for new medicinal preparations normalizing the 'h1/Th2 balance is of paramount importance in the light of current concepts of pathogenesis of atopic bronchial asthma (ABA) that assume hyperactivation of T-helper 2 (Th2) in conjunction with a decrease of T-helper 1 (Th1) to be a leading factor in the development of this pathology. The present in vitro study demonstrated that GMDP (the active ingredient of immunomodulator licopid) modifies proliferation of phytohemagglutinin (PHA)- and anti-CD3-stimulated mononuclear cells (MNC) from healthy donors and patients with ABA. Moreover it was shown that GMDP causes a dose-dependent increase in the production of interferon-gamma (by 3-8 times) and a decrease in the secretion of IL-4 in both native and mitogen-stimulated mononuclear cells of ABA patients. It is concluded that the positive influence of licopid (GMDP) on clinical conditions of the patients with ABA demonstrated in the previous investigations can be attributed to the normalization of 'h1/Th2 balance.

Key words: *licopid, GMDP, cytokines, atopic bronchial asthma, 'h1/Th2 balance*

Бронхиальная астма (БА) — хроническое заболевание, которое представляет угрозу значительной части населения многих индустриальных стран. БА характеризуется хроническим воспалением, которое сопровождается отеком слизистой оболочки и гиперсекрецией слизистых желез, а также спазмом гладкой мускулатуры бронхов. На поздних стадиях рецидивирующие эпизоды бронхоспазма приводят к нарушению целостности эпителии дыхательных путей и изменению (ремоделированию) их структуры [9]. Основные клинические проявления БА характеризуются затруднением дыхания и постоянно повторяющимися приступами удушья, возникающими через короткий промежуток времени после контакта с индуцирующим фактором.

Наиболее частыми индуцирующими агентами, вызывающими развитие и рецидивирование хронического воспаления дыхательных путей, являются аллергены, поступающие из окружающей среды (экзоаллергены) или образующиеся в организме (эндоаллергены). Многочисленные клинико-иммунологические исследования [10, 11, 13] подтвердили, что в основе патогенеза atopической БА (АБА) лежит системное аллергическое воспаление, обусловленное нарушением баланса двух субпопуляций Т-хелперов 1-го и 2-го типов (соответственно Th1 и Th2), гиперпродукцией интерлейкина (ИЛ)-4, активацией эозинофилов и тучных клеток [17]. В настоящее время известно, что при АБА активированные Th2 проникают в слизистую оболочку бронхов [15] и выделяемые ими цитокины (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-9 и ИЛ-13) в большой степени ответственны за появление и дальнейшее обострение острой фазы аллергической реакции, которая провоцирует резкий бронхоспазм [18, 19]. При этом повышенное содержание Th2 сопровождается снижением количества Th1 [16]. В связи с этим одним из патогенетически обоснованных подходов к терапии АБА можно считать использование лекарственных препаратов, способных нормализовать Т-хелперный баланс в сторону снижения активности Th2 и(или) повышения активности Th1.

Иммуноотропные препараты на основе мурамилпептидов, фрагментов пептидогликана клеточных стенок всех известных бактерий, обладают широким спектром биологической и фармакологической активности [1, 3, 4, 6—8]. Проведенные ранее клинические исследования показали, что ликопид,

отечественный иммуностимулятор на основе глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП), оказывает положительное влияние на состояние больных АБА [5]. Однако авторы интерпретировали улучшение течения заболевания на фоне приема ликопида как усиление иммунитета пациентов и предотвращение вследствие этого инфекционных осложнений АБА. Анализ данных литературы позволяет предположить, что обнаруженный положительный терапевтический эффект ГМДП при АБА может быть также обусловлен его патогенетическим воздействием на механизм аллергического воспаления, в частности, нормализацией у пациентов баланса Th1/Th2 [2, 14].

Для проверки данного предположения в рамках наших исследований была проведена оценка влияния ГМДП на выработку основных цитокинов Th1 и Th2. Активность Th1 регистрировали по продукции интерферона- γ (ИФН- γ) стимулированными *in vitro* мононуклеарными клетками (МНК) периферической крови здоровых доноров и пациентов с АБА средней тяжести; оценку активности Th2 производили в аналогичных условиях по количеству секретируемого ИЛ-4.

Материалы и методы. Обследовано 7 пациентов в возрасте от 22 до 42 лет с верифицированным диагнозом АБА средней тяжести, не получавших на протяжении последних 3 мес системных и топических кортикостероидов или каких-либо других иммуноотропных препаратов. Длительность заболевания составила от 3 мес до 1,5 лет. Контрольная группа включала 11 здоровых доноров. У всех пациентов и доноров было получено информированное согласие на использование данных исследований в научных целях.

Выделение МНК и подготовка их к культивированию. Для исследования использовали венозную кровь, которую собирали в пробирки с антикоагулянтом (на 1 мл крови 0,1 мл раствора 2,7% соли ЭДТА pH 7,2—7,4). Все процедуры осуществляли в стерильных условиях при комнатной температуре. Цельную кровь разводили раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ) в соотношении 1:3, наслаивали на раствор фикола—верографина (1,077) и центрифугировали 40 мин при 400 g. МНК дважды отмывали путем центрифугирования (10 мин, 1000 об/мин) в избытке ФСБ и ресуспендировали в полной среде RPMI 1640, содержащей 10% эмбриональной коровьей сыворотки, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 10 мМ HEPES pH 7,2. Количество МНК подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность клеток определяли по окраске трипановым синим.

Оценка стимулированной пролиферации МНК. Для исследования стимулированной пролиферации МНК проводили реакцию бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ), используя в качестве митогенов ФГА ("Панэко", Россия) или анти-CD3-моноклональные антитела JCO-90 ("МедБиоСпектр", Россия) в конечных концентрациях соответственно 10 и 4 мкг/мл. МНК в количестве $0,2 \cdot 10^6$ разносили в лунки 96-луночного круглодонного плейта и добавляли митогены; в опытные лунки вносили ГМДП в концентрациях от 0,05 до 5 мкг/мл, в контрольные — равный объем ФСБ. Плейты инкубировали 72 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. За 16 ч до окончания культивирования в лунки вносили 5 мкКи/мл меченного по тритию тимидина. По

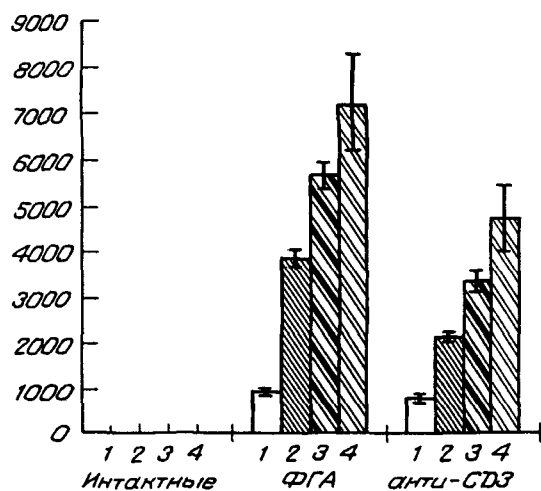


Рис. 1. Секретция ИФН-γ (в пг/мл) МНК здоровых доноров. Здесь и на рис. 2–3: 1 — контроль, 2 — ГМДП 0,05 мкг/мл, 3 — ГМДП 0,5 мкг/мл, 4 — ГМДП 5 мкг/мл.

истечения времени инкубации клетки отмывали на автоматическом сборщике клеток, переноса радиоактивный материал на стекловолоконные фильтры типа HA-930 ("Whatmann", UK). Высушенные фильтры помещали во флаконы из кварцевого стекла, содержащие сцинтиллятор (4 г 1-4-ди(5-фенил)-2-оксазолил бензола и 0,1 г 2,5-дифенилоксазола на 1 л толуола). Радиоактивность включенного тимидина определяли на счетчике β-частиц. Эффект влияния ГМДП на пролиферацию лимфоцитов рассчитывали по формуле:

$$\text{Эффект} = \left(\frac{n_{\text{имп/мин}} \text{ в опыте}}{n_{\text{имп/мин}} \text{ в контроле}} \right) \cdot 100\%$$

Определение концентраций цитокинов ИЛ-4 и ИФН-γ проводили в 3-суточных супернатантах интактных и стимулированных митогенами МНК с помощью иммуноферментного анализа. Для оценки содержания цитокинов использовали коммерческие наборы реагентов фирмы ООО "Цитокин" (Россия) по методике, рекомендованной производителем.

Результаты и обсуждение. Влияние ГМДП на пролиферативную активность Т-лимфоцитов здоровых доноров и больных АБА. Во всех исследованных концентрациях ГМДП не оказывал влияния на пролиферацию интактных МНК, полученных как от здоровых доноров, так и от больных АБА. Напротив, инкубация ФГА- и анти-CD3-активированных клеток с ГМДП приводила к изменению их пролиферативной активности. Эффект ГМДП имел существенные индивидуальные отличия от донора к донору и зависел от исходного уровня стимулированной пролиферации (данные не представлены). В целом, влияние ГМДП на пролиферацию Т-лимфоцитов здоровых доноров и больных АБА может рассматриваться как модулирующее: ингибирование пролиферации высокоотвечающих на митогены клеток и активация низкоотвечающих.

Влияние ГМДП на продукцию ИФН-γ МНК здоровых доноров и больных АБА. Как видно на рис. 1, интактные МНК здоровых доноров не секретировали ИФН-γ ни спонтанно, ни под влиянием любой из исследованных концентраций ГМДП. В отличие от здоровых лиц у больных АБА интактные МНК имели определяемый уровень спонтанной продукции ИФН-γ (около 150 пг/мл), что свидетельствует о преактивированном состоянии этих клеток (рис. 2). Добавление ГМДП к интактным МНК больных АБА вызывало значительное усиление

секреции цитокина (более чем в 3 раза при концентрации ГМДП 5 мкг/мл).

Митогенная (ФГА или анти-СВЗ) стимуляция МНК здоровых доноров и больных АБА приводила к скачкообразному возрастанию секреции ИФН-γ, которое было более выраженным в культурах клеток больных. При всех концентрациях ГМДП демонстрировал дозозависимый костимулирующий эффект, увеличивая продукцию цитокина в 3–8 раз.

Влияние ГМДП на продукцию ИЛ-4 МНК здоровых доноров и больных АБА. Интактные МНК здоровых доноров не продуцировали определяемых количеств ИЛ-4 как в отсутствие, так и в присутствии ГМДП. Митогенная стимуляция этих клеток приводила к незначительному и недостоверному возрастанию уровня цитокина на границе чувствительности используемого набора (0–3 пг/мл). Добавление ГМДП к стимулированным МНК здоровых доноров не вызывало увеличения концентрации ИЛ-4 в супернатантах (данные не представлены).

У больных АБА уровень спонтанно продуцируемого МНК ИЛ-4 достоверно превышал его значение у здоровых доноров и составлял в среднем 6 пг/мл, а в присутствии митогенов доходил до 12 пг/мл. Добавление ГМДП в культуры интактных и стимулированных МНК больных АБА приводило к достоверному дозозависимому снижению продукции ИЛ-4 (рис. 3): до 2–4 пг/мл для интактных и 5–6 пг/мл для митогенстимулированных клеток (данные представлены для концентрации ГМДП 5 мкг/мл).

Полученные результаты демонстрируют, что ГМДП в диапазоне концентраций 0,05 до 5 мкг/мл моделирует пролиферативную активность, дозозависимо усиливает продукцию ИФН-γ и снижает секрецию ИЛ-4 интактными и митогенстимулированными Т-лимфоцитами больных АБА, что может быть интерпретировано как изменение Т-хелперного баланса в пользу активации Th1-субпопуляции. Особо следует отметить, что активность ГМДП реализуется только в отношении активированных (аллергенами или митогенами) лимфоци-

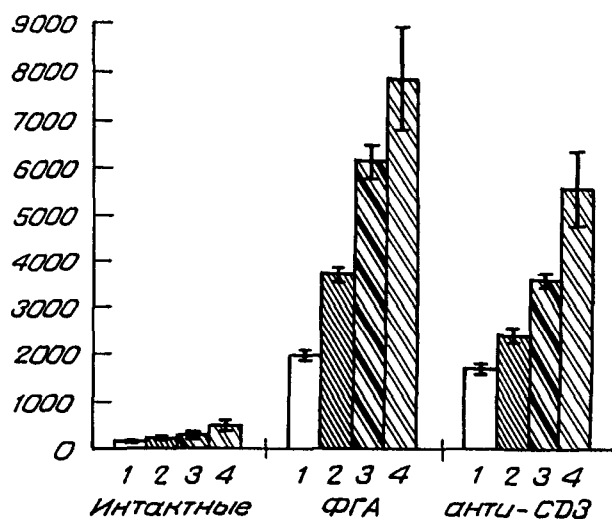


Рис. 2. Секретция ИФН-γ (в пг/мл) МНК больных АБА.

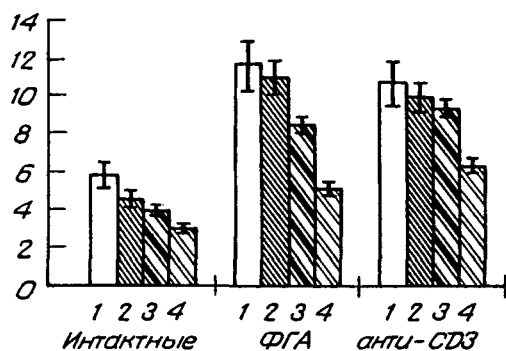


Рис. 3. Секретия ИЛ-4 (в пг/мл) МНК больных АБА.

тов и не проявляется на интактных клетках (нестимулированные МНК здоровых доноров).

Поскольку основной мишенью для ГМДП являются клетки врожденного иммунитета, экспрессирующие внутриклеточный рецептор NOD-2 [12], очевидно, воздействие этого вещества на Т-хелперы имеет непрямой характер и опосредуется через имеющиеся в популяции МНК моноциты и дендритные клетки.

Более того, наблюдаемое под влиянием ГМДП усиление продукции ИФН- γ также может рассматриваться как не связанное с повышением активности Th1, тем более что в предшествующих работах был показан ИФН- γ -стимулирующий эффект ГМДП в отношении макрофагов при инфекционно-воспалительных процессах [2]. Однако сравнение количественных показателей, полученных в данной работе, позволяет заключить, что ГМДП через воздействие на клетки врожденного иммунитета (очевидно, через изменение цитокинового профиля этих клеток) приводит в конечном счете к усилению цитокинпродуцирующей активности Th1. Для этого достаточно сравнить показатели влияния ГМДП на продукцию ИФН- γ интактными и анти-CD3-стимулированными МНК больных АБА (см. рис. 2). Действительно, без селективной (анти-CD3-антитела) Т-клеточной активации ГМДП (5 мкг/мл) вызывает возрастание продукции ИФН- γ только со 150 до 500 пг/мл (+350 пг/мл), тогда как при стимуляции Т-клеток его эффект существенно возрастает — с 1700 до 5500 пг/мл (+3800 пг/мл). В случае интактных МНК здоровых доноров (уровень исходной продукции ИФН- γ равен 0) влияния ГМДП на усиление продукции ИФН- γ вообще не наблюдается.

В отношении способности ГМДП изменять Т-хелперный баланс данные, касающиеся продукции ИЛ-4 МНК больных АБА, выглядят еще более убедительными. Известно, что главными продуцентами ИЛ-4 являются именно Th2 и обнаруженное понижение продукции этого цитокина под действием ГМДП служит еще одним доказательством изменения Т-хелперного баланса в сторону повышения активности Th1.

Таким образом, полученные ранее клинические данные об улучшении состояния больных АБА при терапии ликопидом (ГМДП) [5] могут быть интерпретированы не только как предотвращение инфекционных осложнений основного заболевания, но и

как непосредственное воздействие ГМДП на процесс аллергического воспаления, а именно — сдвиг баланса Т-хелперов в сторону снижения активности патогенетически значимых для АБА Th2-клеток.

Работа выполнена при поддержке ЗАО Пептек, Гранта Президента РФ "Научные школы" № НШ-5737.2008.4. и программы РАН "Молекулярная и клеточная биология".

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов В. Т., Хаитов Р. М., Андропова Т. М., Пинегин Б. В. Ликолипид (глюкозаминилмурамилдипептид) — новый отечественный высокоэффективный иммуномодулятор для лечения и профилактики заболеваний, связанных со вторичной иммунологической недостаточностью // Иммунология. — 1996. — № 2. — С. 4–6.
2. Колесникова Н. В., Коков Е. А., Андропова Т. М. и др. Регуляция мурамилдипептидами синтеза иммуноглобулина Е в эксперименте и клинике // Рос. аллергол. журн. — 2008. — № 5. — С. 48–54.
3. Пинегин Б. В., Хаитов Р. М. Иммуномодуляторы и некоторые аспекты их клинического применения // Клин. мед. — 1996. — № 8. — С. 7–12.
4. Пинегин Б. В., Андропова Т. М., Курсанова М. И. Препараты мурамил-дипептидного ряда — иммуностропные средства нового поколения // Ликолипид в комплексном лечении и профилактике иммунодефицитных состояний. — М., 2005. — С. 19–36.
5. Урбан Е. О. Эффективность иммуномодулирующей терапии у детей с бронхиальной астмой, с сопутствующим синдромом вторичной иммунной недостаточности: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Ростов н/Д, 2004.
6. Adam A., Lederer E. Muramylpeptides: immunomodulators, sleep factors and vitamins // Med. Res. Rev. — 1984. — Vol. 4. — P. 111–152.
7. Andronova T., Ivanov V. The structure and immunological function of glucosaminylmuramylpeptides // Sov. Med. Rev. D. Immunol. (Harwood Academic Publishers). — 1991. — Vol. 4. — P. 1–63.
8. Barr G. M., Darcissac E., Bevec D. et al. Immunopharmacological activities and clinical development of muramyl peptides with particular emphasis on murabutide // Int. J. Immunopharmacol. — 1995. — Vol. 17. — P. 117–131.
9. Bousquet J., Jefrey P. K., Busse W. W. et al. Asthma: from bronchoconstriction to airways inflammation and inflammation and remodeling // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2000. — Vol. 161. — P. 1720–1745.
10. Cohen Sheldon G., Evans R. Asthma, allergy and immunotherapy; a historical review // Allergy Asthma Proc. — 1991. — Vol. 12, N 6. — P. 407–416.
11. Giannini A. V., Schulz N. D., Chang T. T., Wong D. C. The Best Guide to Allergy. — New York, 1985.
12. Girardin S. E., Boneca I. G., Viola J. et al. NOD2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278. — P. 8869–8872.
13. Holt P. G., Macaubas C., Stumbles P. A., Sly P. D. The role of allergy in the development of asthma // Nature. — 1999. — Vol. 402. — P. B12–B17.
14. Hye Jim Kim, Jae Seung Yang, Sang Su Woo et al. Lipoteichoic acid and muramyl dipeptide synergistically induce maturation of human dendritic cells and concurrent expression of proinflammatory cytokines // J. Leukoc. Biol. — 2007. — Vol. 81. — P. 983–989.
15. Kay A. B. Review articles: advances in immunology: allergy and allergic diseases // N. Engl. J. Med. — 2001. — Vol. 344. — P. 30–37.
16. Magnan A. O., Mely L. G., Camilla C. A. et al. Assessment of the Th1/Th2 paradigm in whole blood in atopy asthma. Increased IFN- γ -producing CD8+ T-cells in asthma // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2000. — Vol. 161, N 6. — P. 1790–1796.
17. Renaud J.-C. New insights into the role of cytokines in asthma // J. Clin. Pathol. — 2001. — Vol. 54. — P. 577–589.
18. Wills-Karp M., Luyimbazi J., Xu X. et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma // Science. — 1998. — Vol. 282. — P. 2258–2261.
19. Wills-Karp M., Chiaramonte M. Interleukin-13 in asthma // Curr. Opin. Pulm. Med. — 2003. — Vol. 9. — P. 21–27.

Поступила 28.01.09