

5. Жаворонкова А. А. // Арх. пат. — 1977. — № 39. — С. 83—91.
6. Сейц И. Ф., Луганова И. С. // Биохимия клеток крови. — М., 1967. — С. 113—114.
7. Степко Е. А., Гаприлюк Л. А., Годорожа П. Д., Спиной Ю. Г. // *Anale Stiintifice* (Кишинев). — 2005. — Т. 3в. — С. 524—527.
8. Conn E. E., Vennesland A. // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 192. — P. 17—30.
9. Cowell D. C., Taylor W. H. // *Ann. Clin. Biochem.* — 1981. — Vol. 18, N 2. — P. 76—83.
10. Fluorides. Environmental Health Criteria 227. World Health Organization. — Geneva, 2002.
11. Gao Y., Yu B., Chang Z. // *Fluoride.* — 1998. — Vol. 31, N 3. — P. 51—53.
12. Giblin F., Wies D., Reddy V. // *Exp. Eye Res.* — 1981. — Vol. 33, N 3. — P. 289—298.
13. Grover Ph. // *Biochem. Soc. Trans.* — 1982. — Vol. 10, N 2. — P. 80—82.
14. Habig W. H., Jacoby W. B. // *Meth. Enzymol.* — 1981. — Vol. 77. — P. 398—405.
15. Hofman L. F. // *J. Nutr.* — 2001. — Vol. 131, N 5. — P. 1621—1625.
16. Kosower N. S., Kosower E. M. // *Int. Rev. Cytol.* — 1978. — Vol. 54. — P. 109—160.
17. Maffi D., Pasquino M. T., Caprari P. et al. // *Clin. Chim. Acta.* — 2002. — Vol. 321, N 1—2. — P. 43—47.
18. Mannervik B. // *Acta Chem. Scand.* — 1969. — Vol. 23, N 8. — P. 2912—2914.
19. Mannervik B., Axelsson R. // *Functions of Glutathione in Liver and Kidney* / Eds H. Sies, A. Wendel. — Berlin, 1978.
20. Monsour P. A., Kruger B. J. // *Fluoride.* — 1985. — Vol. 18. — P. 53—61.
21. Reddy G. B. // *Toxicol. Sci.* — 2003. — Vol. 72, N 2. — P. 363—368.
22. Reed D. I. // *Biochem. Pharmacol.* — 1986. — Vol. 35, N 1. — P. 7—13.
23. Sedlak I., Lindsay R. H. // *Anal. Biochem.* — 1968. — Vol. 25, N 2. — P. 192—198.
24. Shashi A. // *Fluoride.* — 1994. — Vol. 27. — P. 155—159.
25. Shivarajashankara J. M. // *Fluoride.* — 2001. — Vol. 34. — P. 103—107.
26. Shivarajashankara J. M. // *Fluoride.* — 2002. — Vol. 35. — P. 12—21.
27. Streckfus C. F., Bigler L. R. // *Oral Dis.* — 2002. — Vol. 8, N 2. — P. 69—76.
28. Tabak L. A. // *J. Dent. Educ.* — 2001. — Vol. 65, N 12. — P. 1335—1339.
29. Tarra M., Rodamilans M., Corbella Y. // *Total Environ.* — 1998. — Vol. 220, N 1. — P. 81—85.
30. Vani M. L., Reddy K. P. // *Fluoride.* — 2000. — Vol. 33. — P. 17—26.
31. Watanabe N., Kamei S., Ohkuto A. // *Clin. Chem.* — 1986. — Vol. 32. — P. 1551—1554.
32. Yoshi P. // *J. Assoc. Physicians India.* — 1982. — Vol. 30, N 6. — P. 369—370.
33. Ziegler D. M. // *Ann. Rev. Biochem.* — 1985. — Vol. 54. — P. 305—329.

Поступила 15.02.06

IMPACT OF ANTIOXIDATIVE THERAPY ON THE ACTIVITY OF SALIVARY GLUTATHIONE-DEPENDENT ENZYMES IN PATIENTS WITH FLUOROSIS. L. A. Gavriluk, Ye. A. Stepko, Yu. G. Spinei, A. I. Vartichan, L. T. Lysyi

Fluorosis caused by long-term intake of high fluoride levels is characterized by clinical bone and tooth manifestations. The adverse impact of high fluoride intake was also observed in soft tissues. Although fluorosis is irreversible it could be prevented by appropriate and timely interventions through the understanding of the process at biochemical and molecular levels. Increased production of reactive oxygen forms and lipid peroxidation are considered to play an important role in the pathogenesis of chronic fluoride toxicity. Saliva is a biological fluid of the human organism may be a reflection of the metabolic state. Salivary indices are clinical diagnostic indicators. The purpose of this investigation was to comparatively study the salivary antioxidative defense system, including glutathione, glutathione reductase, glutathione-S-transferase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase in adult patients with fluorosis before and after complex antioxidative therapy. Analysis indicated that there was a negative correlation between the level of glutathione and the clinical characteristics of the disease in patients with fluorosis. There was a direct relationship between the activity of glutathione-S-transferase and the clinical manifestations in the patients. These results reflected dose-dependent fluoride intoxication and metabolic imbalance. The imbalanced salivary antioxidative defense system was in part corrected by complex antioxidative therapy.

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2007

УДК 616-078.33

Ю. А. Неустроева, Т. А. Тихомирова, Н. В. Дунаева, С. В. Лапин, А. А. Тотолян

ОПТИМИЗАЦИЯ ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО МЕТОДА ВЫЯВЛЕНИЯ КРИОГЛОБУЛИНОВ В УСЛОВИЯХ КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова

Криоглобулины (КГ) — моноклональные иммуноглобулины или иммунные комплексы, преципитирующие при температуре сыворотки ниже 37°C, а затем растворяющиеся в сыворотке при нагревании последней до 37°C [5]. Впервые КГ были обнаружены Wintrobe в 1933 г. у больного множественной миеломой [1, 8]. В 1947 г. Lerner и Watson впервые употребили термин "криоглобулины" для белков, образующих преципитат в сыворотке при температуре ниже 37°C. Согласно общепринятой классификации, предложенной J. C. Brouet в 1974 г. [1], КГ в зависимости от наличия активности ревматоидного фактора (РФ), класса и кло-

нальности иммуноглобулинов, входящих в состав криопреципитата (КП), разделяются на 3 типа (см. таблицу) [1, 6—8, 10].

КГ I типа относятся к простым КГ, которые состоят из моноклонального иммуноглобулина или легкой цепи иммуноглобулина, известного как белок Бенс-Джонса. КГ I типа встречаются при таких лимфопролиферативных заболеваниях, как миелома, лимфома, макроглобулинемия Вальденстрема, хронический лимфолейкоз. Простые КГ клинически манифестируют редко, обычно в виде синдрома Рейно. В исключительных случаях они

Классификация КГ

Характеристика КГ	Тип КГ		
	I	II	III
Встречаемость	5—25%	40—60%	40—50%
Состав КГ	Моноклональные IgM, IgG2, IgG3, реже IgA или легкие цепи Ig	Моноклональные IgM, реже IgG, IgA и поликлональные IgG	Поликлональные Ig всех классов
Свойства КГ	Самоагрегация через Fc-фрагмент Ig	Моноклональный компонент обладает активностью РФ	РФ обычно представлен поликлональным IgM
Заболевания	Множественная миелома, болезнь Вальденстрема, ХЛЛ, В-НХЛ	Вирусный гепатит С, другие вирусные инфекции, аутоиммунные заболевания, ЛПФЗ	Вирусный гепатит С, другие вирусные инфекции, аутоиммунные заболевания, ЛПФЗ

Примечание. ХЛЛ — хронический лимфолейкоз; В-НХЛ — В-клеточная неходжкинская лимфома; ЛПФЗ — лимфопролиферативные заболевания.

могут быть причиной артериального тромбоза с дистальным некрозом кистей и стоп.

КГ II и III типов часто называют смешанными из-за присутствия в КГ разных классов иммуноглобулинов, один из которых обладает активностью РФ. Таким образом, смешанные КГ представляют собой иммунные комплексы, где в качестве антитела и антигена выступают иммуноглобулины. Ко II типу относятся КГ, состоящие из одного поликлонального иммуноглобулина, соединенного с моноклональным РФ. К КГ III типа относятся иммунные комплексы, образованные поликлональными иммуноглобулинами разных классов. Основной причиной смешанной криоглобулинемии являются хронические вирусные инфекции, прежде всего вирус гепатита С, а также ревматические заболевания, в частности системная красная волчанка, синдром Шегрена, склеродермия, ревматоидный артрит.

Следует отметить, что клинические проявления смешанной криоглобулинемии могут быть не замечены на фоне основного ревматического заболевания, что в большей степени относится к КГ III типа. Для КГ II типа на фоне гепатита С, напротив, наиболее характерно проявление клинической симптоматики без наличия видимой причины. Случаи обнаружения симптомов криоглобулинемии без очевидных клинических проявлений основного заболевания входят в понятие эссенциальной криоглобулинемии (ЭКГМ). В этом случае основанием для обследования с целью установления причин КГ является наличие характерных клинических признаков ЭКГМ.

При смешанной ЭКГМ происходит развитие воспалительных процессов по типу васкулита в мелких и средних сосудах. Клинически это проявляется поражением кожи в виде пурпуры, преимущественно локализующейся на нижних конечностях. Классическим клиническим признаком смешанной ЭКГМ является триада Мельтцера, впервые описанная М. Meltzer и соавт. в 1966 г. [1]. Триада Мельтцера характеризуется наличием у больного пурпуры, артралгии и слабости, к которым присоединяются гломерулонефрит и периферическая полинейропатия.

Согласно недавно опубликованным результатам исследования причин ЭКГМ среди 433 пациентов, у 74% больных был выявлен вирус гепатита С, у 25% диагностированы те или иные аутоиммунные заболевания и лишь у 7% пациентов отмечались лимфопролиферативные заболевания крови [11].

Метод выявления КГ в крови известен сравнительно давно. Однако методики, используемые в исследовательских целях, не подходят для использования в условиях клиничко-диагностической лаборатории ввиду отсутствия единого стандарта исследования. Так, предлагаются разные модификации, касающиеся объема исследуемой сыворотки больного, варьируют температурный режим и сроки оценки результата [4—7, 9]. Не-

смотря на наличие этого теста среди лабораторных показателей, применение которых предусмотрено регламентирующими документами Минздравсоцразвития РФ для лабораторной диагностики [3], его определение редко проводится не только в клиничко-диагностических, но и в специализированных иммунологических лабораториях.

Целью нашей работы стала разработка модификации метода полуколичественного определения КГ для использования в условиях клиничко-диагностической лаборатории. С помощью разработанной модификации было проведено исследование и определение клиничко-диагностической значимости выявления криоглобулинемии у больных хроническим гепатитом С (ХГС).

Материалы и методы. Обследованы 115 больных с серологически подтвержденным ХГС (46 мужчин и 69 женщин) в возрасте от 17 до 69 лет. Средний возраст составил $38,6 \pm 12$ лет ($\bar{X} \pm \sigma$).

В качестве контроля исследованы сыворотки 20 здоровых доноров. Группы были сопоставимы по возрасту и половому соотношению (см. схему метода выявления КГ).

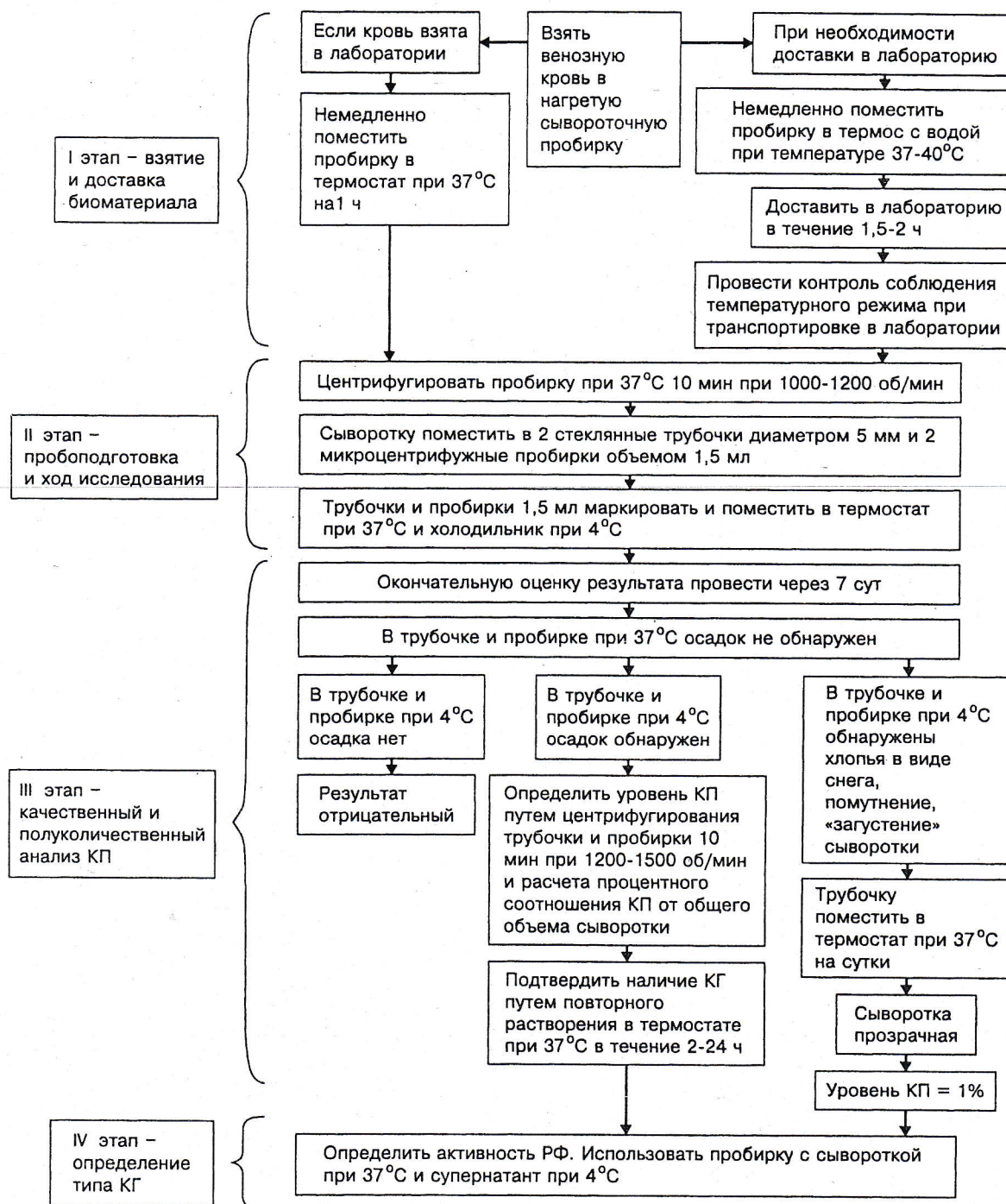
На преаналитическом этапе взятие крови осуществляется строго натощак в количестве не менее 5 мл. Для этого используется предварительно нагретая пробирка с плотно закрывающейся крышкой, желательно использовать вакуумную пробирку типа Vacutainer (BD, США). Биоматериал может быть получен непосредственно в лаборатории и сразу же помещен в термостат при температуре 37°C. При необходимости транспортировки исследуемого образца пробирка после взятия крови немедленно помещается в термос с водой, температура которой должна быть 40°C. Доставка крови в лабораторию осуществляется в течение 1—2 ч.

Доставленная проба крови проходит преаналитический контроль. В лаборатории оценивается правильность сбора и доставки биоматериала, проверяется плотность закрытия пробирки. Производится замер температуры воды в термосе. Температура воды в термосе свыше 40°C после длительной транспортировки свидетельствует о том, что изначально кровь была помещена в воду при нефизиологической температуре. При температуре воды ниже 37°C происходит выпадение КГ и их включение в сгусток крови, что приводит к их необратимой утрате. В случае обнаружения описанных выше ошибок материал на исследование не принимается.

После оценки качества биоматериала пробирка помещается в термостат при температуре 37°C. Процесс свертывания крови должен занимать не менее 1 ч от момента взятия образца.

Центрифугирование пробирки производится в термостатируемой центрифуге при температуре 37°C в течение 10 мин при 1000—1200 об/мин.

Схема метода полуколичественного определения КГ



Полученная сыворотка отделяется от сгустка при температуре 37°C, в нее добавляется раствор азидна натрия в финальной концентрации 0,01%. Сыворотка помещается в 2 стеклянные прозрачные трубочки диаметром не менее 5 мм, длиной не менее 5–6 см и объемом 0,8–1 мл, а также 2 микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл. Каждая пара, состоящая из трубочки и пробирки, маркируется, как показано на рис. 1, и помещается в термостат при 37°C и холодильник при 4°C на 7 дней.

Окончательная оценка результата проводится через 7 сут. Сыворотка, находившаяся при 37°C, должна быть прозрачной, без осадка или хлопьев. Если сыворотка в

трубочке и пробирке, находившихся в холодильнике, прозрачная, без хлопьев и осадка, то КГ не обнаружены и результат считается отрицательным.

Типичный результат обнаружения КГ приведен на рис. 2. Осадок, образованный КГ при 4°C, может быть представлен в виде хлопьеобразной взвеси, кристаллов или геля. При выявлении осадка трубочка и пробирка, находившиеся при 4°C, центрифугируют 10 мин при 1200–1500 об/мин при 4°C. Для подсчета количества КГ используется формула для расчета процентного соотношения КГ к объему сыворотки (см. рис. 2):

$$\text{КГ} = \frac{\text{осадок (см)}}{\text{осадок (см)} + \text{сыворотка (см)}} \cdot 100\%.$$

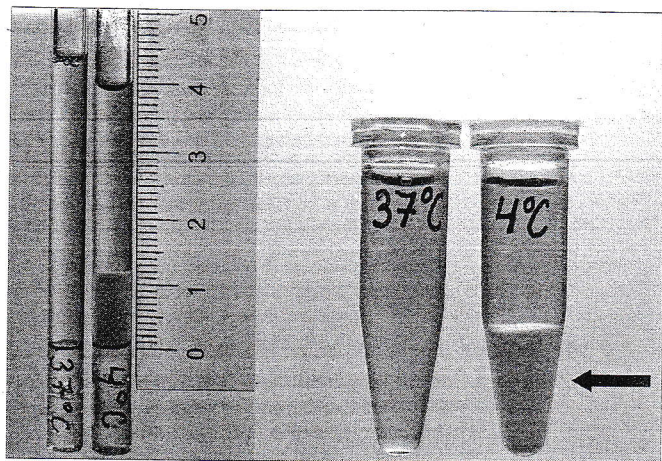


Рис. 1. Методика полуколичественного определения КГ. Этап оценки полученных результатов. На рисунке продемонстрировано образование КП в виде геля в трубке и микроцентрифужной пробирке объемом 1,5 мл при 4°C (указано стрелкой) и отсутствие осадка при 37°C. В трубке производится расчет уровня криокрита.

Для подтверждения наличия КГ необходимо добиться полного растворения КП. Для этого трубочка помещается в термостат на 2–24 ч.

При образовании небольших количеств КГ в трубке и пробирке, находившихся при 4°C, не обнаруживало видимого осадка, но наблюдало минимальное количество хлопьев в виде снега, помутнение или "загустение" сыворотки по сравнению с сывороткой при 37°C. В этом случае требуется подтверждение наличия КГ путем инкубации трубочки в термостате при 37°C в течение суток. Если на следующий день хлопья, помутнение или "загустение" исчезли, то результат считается положительным и уровень криокрита условно составляет 1%.

Для определения типа КГ мы использовали выявление РФ методом агглютинации частиц латекса (РАО "БИОПРЕПАРАТ", СПб). Для этой методики используется сыворотка из пробирки, находившейся при 37°C, и супернатант, полученный после центрифугирования пробирки при 4°C. Если титр РФ, обнаруженного в цельной сыворотке, превышает титр РФ из супернатанта, то это значит, что РФ входит в состав КП.

В дальнейшем полученный КП можно использовать для определения состава КГ и клональности иммуноглобулинов с помощью различных иммунодиагностических методов, таких как иммуноэлектрофорез, иммунофиксация или иммуноблоттинг [8].

Результаты и обсуждение. Методика определения КГ основана на физико-химических свойствах и особенностях КГ различных типов. Для КГ I типа характерны высокая концентрация и исходно низкая растворимость в крови. Соответственно КП образуется при более высоких температурах и более быстро, обычно в течение первых суток [7, 9]. Часто процесс преципитации начинается сразу же после заполнения сывороткой холодной трубочки. Характер преципитации КГ I типа определяется классом иммуноглобулинов, входящих в состав КП [1, 7]. Так, моноклональные IgG и IgM на холоде образуют гель, моноклональный IgA образует хлопьеобразную взвесь, IgG₂ образуют кристаллы. В отличие от простых смешанных КГ встречаются в более низких концентрациях и образуют КП в течение нескольких дней и в основном в виде золя или геля [7, 8].

Методика определения КГ требует строгого соблюдения температурного режима на всех этапах. Взятие крови осуществляется быстро в предварительно нагретую

пробирку. Задержка в перемещении пробирки в термос может привести к необратимой потере КГ и ложноотрицательным результатам. На этапе взятия крови и доставки биоматериала необходимо контролировать температуру воды в термосе. Мы рекомендуем использовать стеклянный термос объемом не менее 1 л. Данный термос подходит для длительной транспортировки. Железный термос обладает более высокой теплопроводностью и может использоваться только для кратковременной транспортировки.

Известно, что нарушение функции печени в результате основного заболевания может приводить к развитию гиперлипидемии у данной категории больных. В связи с этим для исключения нежелательного увеличения липидов в биоматериале, которые при охлаждении могут увеличивать объем КП, взятие крови должно производиться строго натощак.

Следует отметить, что среди больных, заболевания которых ассоциированы с наличием КГ, в редких случаях возможно присутствие феномена криофибриногенемии, отличного от криоглобулинемии. Для криофибриногена характерен процесс преципитации в плазме [8]. Согласно нашим исследованиям, данный феномен встречается редко (1 случай на 135 пациентов). Этап хранения крови в течение часа с момента ее взятия, а также дальнейший этап центрифугирования при 37°C позволяют образоваться сгустку и улучшить процесс осаждения фибрина и фибриногена для исключения их из процесса дальнейшего образования КП.

Выраженность клинических проявлений не зависит от уровня КП [5, 6], и даже незначительное количество КГ может приводить к характерной клинической симптоматике. Динамика содержания КП позволяет оценить эффективность проводимой патогенетической терапии. Очевидно, что качество визуализации низких концентраций КГ прямо пропорционально объему исследуемой сыворотки. Поэтому для исключения ложноотрицательных результатов очень важно иметь достаточный объем сыворотки, в которой происходит преципитация. Мы рекомендуем использовать трубочки диаметром не менее 5 мм, длиной не менее 5–6 см и объемом не менее 1 мл. Применение трубочек с одинаковым сечением позволяет оценить уровень КП без сложных расчетов. Нами были проведены сравнительные исследования использования капилляров для газоанализатора или определения СОЭ с сечением 1 мм, а также химических пробирок, требующих объема сыворотки не менее 8 мл. Результаты показали, что в 30% случаев КП с уровнем от 1–5% определялся в трубочках

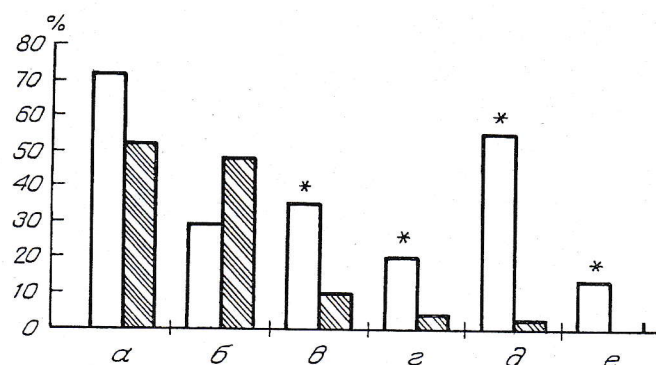


Рис. 2. Определение достоверных связей между наличием КГ и клиническими проявлениями у больных ХГС.

Светлые столбики — больные с наличием КГ, темные — больные без КГ. По оси абсцисс: а — женщины, б — мужчины, в — цирротическая стадия ХГС, г — геморрагический васкулит, д — РФ, е — триада Мельцера. * — $p < 0,05$.

диаметром 5 мм, но не определялся в более тонких капиллярах. Причиной этого может служить недостаточный объем исследуемой сыворотки. Пробирки, рассчитанные на большой объем сыворотки, не подходят для клинико-диагностической лаборатории, так как необходимый объем исследуемой сыворотки составляет не менее 7–8 мл крови. Для дополнительного контроля процесса криопреципитации мы применяем микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, используя их в дальнейшем на этапе определения типа КГ. Таким образом, для наиболее корректного осуществления процесса криопреципитации и дальнейшей оценки результата рекомендуется использовать трубочку с сечением 5 мм и микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.

При проведении серии опытов по временной оценке КП нами было показано, что в 27% случаев процесс образования КП происходил начиная с 4-го дня. Поэтому самым оптимальным промежутком времени для корректной оценки окончательных результатов стал интервал 7 сут, согласующийся с данными других исследований [6, 7]. Однако следует учесть, что такой временной показатель характерен для выявления именно смешанных КГ. Для КГ I типа образование КП возможно и в течение 24–28 ч [8]. Поэтому становится возможным проведение предварительной оценки наличия КП на 3-и сутки.

Использование повторного нагревания и последующего растворения образованного КП при 37°C является основным подтверждением обнаружения КГ. При многократном нагревании и охлаждении сыворотки уровень концентрации КГ I типа не меняется. Для смешанных КГ, наоборот, при проведении повторных циклов характерно снижение фракции растворимых КГ и соответственно уменьшение уровня КП. Необходимо учитывать данные свойства при проведении методики выявления КГ.

Важным отличием смешанных КГ от простых является наличие РФ в составе КП у КГ II и III типов. Для определения типа КГ мы использовали методику выявления РФ с учетом его потребления в составе КП. Таким образом, мы рекомендуем использовать определение РФ в качестве скринингового метода для выявления смешанных КГ.

При использовании описанной модификации методики выявления КГ было проведено исследование на наличие КГ у 115 больных ХГС [2] (рис. 2). В результате КГ были выявлены у 40% (46/115) больных ХГС, из них 54,3% пациентов имели активность РФ. Встречаемость РФ в группе больных с КГ была достоверно выше (54,3 и 21% соответственно; $p < 0,05$).

У 54,3% пациентов статистически достоверно установлена смешанная криоглобулинемия, которая определялась с помощью выявления активности РФ ($p < 0,05$). Из клинических проявлений криоглобулинемии у больных ХГС в 19,5% (9/46) случаев (достоверно чаще) имело место наличие геморрагического васкулита ($p < 0,05$), в то время как среди больных, у которых КГ

обнаружены не были, геморрагический васкулит выявлялся лишь в 2,9% (2/69) случаев (см. рис. 2). Триада Мельтцера присутствовала в 13% (6/46) случаев и исключительно у больных с обнаруженными КГ ($p < 0,05$). В 70% случаев криоглобулинемия встречалась у женщин. Среди больных с КГ достоверно чаще (в 32% случаев — 15/46) наблюдалась цирротическая стадия ХГС, чем в группе больных без КГ (8,6%). Следует отметить, что уровень концентрации КГ в исследуемых образцах сыворотки больных не влиял на степень выраженности клинических проявлений криоглобулинемии, что согласуется с данными литературы [5].

Таким образом, у больных ХГС наблюдается высокая встречаемость смешанной криоглобулинемии, а выраженность клинических проявлений данного процесса характерна для цирротической стадии ХГС. Разработанная модификация метода выявления КГ является адаптированной для проведения исследования в условиях практической лаборатории. Данная методика обладает такими несомненными положительными качествами, как простота, дешевизна и высокая информативность. Основным недостатком метода является длительность проведения исследования, которая не позволяет определить показатель в экстренном порядке. Тем не менее данный метод с успехом можно использовать в любой клинико-диагностической лаборатории для улучшения диагностики такого тяжелого заболевания, как ЭКГМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Константинова Н. А. Криоглобулины и патология. — М., 1999.
2. Неустроева Ю. А., Тихомирова Т. А., Дунаева Н. В. и др. // Мед. иммунол. — 2004. — Т. 6, № 3–5. — С. 321.
3. О состоянии и мерах по совершенствованию лабораторного обеспечения диагностики и лечения пациентов в учреждениях здравоохранения Российской Федерации. Приказ № 380 МЗ РФ от 25.12.1997. — М., 1997.
4. Уоллис Д., Метцгер А., Эшман Р. // Клиническая иммунология и аллергология / Под ред. Г. Лолор-мл. и др: Пер. с англ. — М., 2000.
5. Abel G., Knight G. B., Agnello V. // Autoantibodies. — Amsterdam, 1996. — P. 205–208.
6. Ferri C., Zignego A. L., Pileri S. A. // J. Clin. Pathol. — 2002. — Vol. 55. — P. 4–13.
7. Ferri C., Sebastiani M., Giuggioli D. et al. // J. Semarthrit. — 2004. — Vol. 33. — P. 355–374.
8. Gorevic P. D., Galanakis D., Finn A. F. Jr. // Manual of Clinical Laboratory Immunology. — 5-th Ed. — Washington, 2000. — P. 217–233.
9. Kyle R. A., Katzmann J. A. // Manual of Clinical Laboratory Immunology. — 5-th Ed. — Washington, 2000. — P. 156–172.
10. Montagnino G. // Autoantibodies. — Amsterdam, 1996. — P. 195–204.
11. Trejo O., Ramos-Casals M., Garcia-Carrasco M. et al. // Medicine. — 2001. — Vol. 80. — P. 252–262.

Поступила 04.04.06