

**Б.В. Донської, В.П. Чернишов**

## **Система антиідіотипових антитіл як фізіологічний механізм супресії продукції кофакторнезалежних антифосфоліпідних антитіл**

*Исследовали антифосфолипидные антитела (АФА) и антитела, специфичные к идиотипам АФА (АиАФА) у женщин, которым проводится оплодотворение in vitro (in vitro fertilization – IVF). Нами было продемонстрировано достоверное присутствие АиАФА в сыворотках крови пациентов. Содержание АиАФА у женщин с IVF было достоверно сниженным у пациенток с АФА по сравнению с пациентками, той же клинической группы, но без этих антител. Инфузия интравенозного IgG пациенткам с АФА приводила к достоверному снижению их содержания и повышению содержания АиАФА. Уменьшение содержания АФА и повышение АиАФА достоверно коррелировали. В работе продемонстрировано значение системы идиотип – антиидиотип в регуляции продукции АФА.*

### **ВСТУП**

Антифосфоліпідні антитіла (АФА) – це гетерогенна популяція аутоантитіл, що складається з двох основних груп, які відрізняються за механізмом зв'язування з фосфоліпідами тобто кофакторзалежні та кофакторнезалежні [12].

Кофакторзалежні АФА часто асоціюються з тромботичними ускладненнями і є важливим лабораторним маркером антифосфоліпідного синдрому [6]. Кофакторнезалежні АФА в більшості випадків не пов'язані з тромбозами та часто визначаються у пацієнтів без аутоімунних захворювань. Певний час цій групі АФА не приділялося достатньої уваги, однак дослідження останніх років вказують на існування асоціації між наявністю кофакторнезалежних АФА та порушеннями репродуктивної функції у жінок [2]. Крім того, показано, що вони мають виражену ембріотоксичну властивість і цитотоксичність до клітин трофобласту [10]. Кофакторнезалежні АФА з високими показниками афін-

ності можуть подібно до кофакторзалежних порушувати систему гемостазу та брати участь у розвитку тромботичних патологій [11].

Показано, що жінки з кофакторнезалежними АФА мають знижену частоту вагітностей після фертилізації in vitro та високий ризик невиношування [3–5]. Більшість таких антитіл взаємодіє з негативно зарядженими фосфоліпідами (кардіоліпін і фосфатидилсерин), які постійно не знаходяться на зовнішній поверхні мембрани. Однак при активації, апоптозі, відмиранні клітин фосфатидилсерин масово переміщується туди, утворюючи структуру, що відповідає всім вимогам до Т-незалежних антигенів. Така структура завдяки полімерності епітопів, наявності негативно заряду та локалізації на клітині може викликати зшивку антигенспецифічних рецепторів В-лімфоцитів і активувати їх до продукції специфічних антитіл без безпосередньої участі Т-лімфоцитів. Це припущення підтверджується відомостями про індукцію синтезу АФА за допомогою введення аутологічних клітин у стані апоптозу [13].

© Б.В. Донської, В.П. Чернишов

На нашу думку, найвірогіднішим претендентом на роль основної регулювальної ланки в продукції кофакторнезалежних АФА постає систем антиідіотипових до АФА антiл (АiАФА). Мета нашої роботи дослідити систему АФА – АiАФА.

## МЕТОДИКА

Досліджували сироватку 148 пацієнток з безплідністю, що проходили лікування методом запліднення *in vitro* (*in vitro fertilization* – IVF). Сироватку крові відбирали напередодні стимуляції на 19–20-ту добу циклу. Пацієнтки (18 жінок) з підвищеним вмістом АФА (антикардіоліпін або антифосфатидилсерин) отримували терапію інтравенозним у дозі 2 г імуноглобуліном G (IgG; ЗАТ “Біолік”, Україна) за 3–7 діб до перенесення ембріонів. Сироватку в цьому разі забирали безпосередньо до інфузії IgG і через 4–5 діб після неї. Сироватки 20 пацієнток з АФА також були повторно перевірені через 4–5 діб без введення IgG для контролю вмісту АФА й АiАФА. Ці антитіла також досліджували у сироватках 32 пацієнтів, хворих на хронічний вірусний гепатит В і 30 хворих на системний червоний вовчак. Як контроль використовували сироватки крові 71 здорової жінки. Зразки сироваток зберігали при  $-40^{\circ}\text{C}$  до визначення вмісту АФА й АiАФА.

Моноклональні антитіла. За допомогою гібридомної технології нами було отримано кофакторнезалежне мишаче моноклональне АФА, що безпосередньо взаємодіяло з кардіоліпіном і фосфатидилсерином. Як контроль було використано мишаче моноклональне антитіло того самого ізотипу, специфічне до  $\alpha$ -фактора некрозу пухлин людини.

Поліклональні антитіла. Поліклональні кофакторнезалежні АФА людини були виділені з АФА-позитивних сироваток за допомогою протеїн-А-сефарози та афінного очищення на скляних кульках, вкритих

кардіоліпіном. Отримані АФА були мічені сульфо-NHS-біотином (“Pierce”, “Rockford”, США) за стандартною схемою.

Визначення вмісту АФА та антитіл проти  $\beta_2$ -глікопротеїн-1 ( $\beta_2$ -GP1) у сироватці крові людини. Антитіла IgG класу специфічні до кардіоліпіну та фосфатидилсерину в сироватках визначали за допомогою імуноферментного аналізу [1], а специфічні до  $\beta_2$ -GP1 людини – за допомогою тест-системи (“Orgentec”, Німеччина).

Визначення кофакторзалежності АФА. Для визначення кофакторзалежності АФА з АФА-позитивних досліджуваних сироваток виділяли фракції IgG за допомогою протеїн-А-сефарози (“Pharmacia”, Швеція). У виділених фракціях визначали вміст АФА у безкофакторних умовах та при наявності сироваткових кофакторів людини в інкубаційному буфері. Кофакторзалежність виражали через індекс, який підраховували діленням значення оптичної густини (D) лунки, в якій візуалізувалися кофакторзалежні АФА, на значення D лунки, де визначалися лише кофакторнезалежні АФА. Якщо отриманий індекс  $>1,5$ , то зразок вважався таким, що містить кофакторзалежні АФА, якщо ж він  $<1,5$ , то даний зразок містить лише кофакторнезалежні АФА.

Імуноферментний метод детекції АiАФА за взаємодією з моноклональним АФА, іммобілізованим на полістиролі. Лунки планшета (“Nunc polysorp”, Данія) покривали 100 мкл моноклонального АФА або контрольного (2 мкг/мл) у карбонат-бікарбонатному буфері та інкубували протягом ночі при  $+4^{\circ}\text{C}$ . Після чого планшет промивали та блокували 1%-м бичачим альбуміном (“Sigma”, США) протягом 1 год. Після промивання в лунки додавали зразок сироватки 1/50, розведений у 0,1 %-му розчині бичачого альбуміну. Для контролю специфічності реакції в інші пари лунок додавали зразки, розведені 0,1%-м бичачим альбуміном, що містив 20 мкг/мл контроль-

ного моноклонального антитіла або такий самий вміст моноклонального АФА (специфічний контроль). Планшет інкубували 2 год і промивали, після чого в лунки додавали кон'югат пероксидази хрому з козиными антитілами, специфічними до  $\gamma$ -ланцюга IgG людини ("Sigma", США), що містив 0,1%-й розчин бичачого альбуміну, 1%-й розчин козиної сироватки. Після годинної інкубації планшет промивали та додавали у його лунки по 100 мкл 3–3'5'–5-тетраметилбензидин ("Sigma", США) в цитратному буфері з перекисом водню та залишали на 30 хв при +37 °С. Реакцію зупиняли додаванням 100 мкл 5%-ї сірчаної кислоти. Оптичну густину (D) вимірювали на приладі Labsystem Multiscan (Швеція) при довжині хвилі 450 нм.

Від усіх значень D віднімали D контрольних лунок. Кількісно АіАФА виражали в індексі АіАФА, який розраховували так: D досліду /D специфічного контролю.

Імуноферментний метод детекції АіАФА за інгібуючою активністю IgG-фракції сироватки крові людини на реакцією між моноклональним АФА з кардіоліпіном. 1 мкг/мл моноклональних АФА інкубували 10 год з 100 мкг/мл IgG людини (IgG-фракціями сироваток пацієнтів та препарату інтравенозного IgG) або з 100 мкг/мл бичачого альбуміну як контролю (100 % реакції). Після інкубації зразки по 100 мкл додавали до лунок планшета, покритих кардіоліпіном або спиртом (фон). Після годинної інкубації планшет промивали та додавали по 100 мкл козиного пероксидазного кон'югата, специфічного до мишачих IgG, у фосфатному буфері, що містив 0,2%-й альбумін, 1%-й розчин сироватки крові кози, та інкубували 1 год. Візуалізацію проводили, як вказано вище. Від значень D віднімали фонові значення та визначали відсоток інгібіції реакції, використовуючи D контролю без інгібіції як 100%-не зв'язування.

Імуноферментний метод детекції АіАФА

за інгібуючою активністю IgG-фракції сироваток крові людини на реакцією між поліклональними афінно очищеними біотинільованими АФА людини з кардіоліпіном. 3 мкг/мл біотинільованих АФА людини інкубували 10 год з 200 мкг/мл IgG людини (IgG-фракціями сироваток пацієнтів). Візуалізацію та аналіз результатів проводили аналогічно методу з використанням моноклонального АФА.

Вивчення *in vitro* ефекту препарату інтравенозного IgG на АФА в сироватках крові пацієнтів. Досліджувалися сироватки пацієнток, відібрані безпосередньо перед введенням інтравенозного IgG. Сироватку розводили 1:1 розчином інтравенозного IgG (10 мг/мл) або бичачого сироваткового альбуміну (10 мг/мл) та інкубували 10 год при +4°C. Після чого зразки розводили 1:10 фосфатним буфером визначали вміст АФА й АіАФА.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Попередньо нами було показано [3], що всі досліджувані групи мали достовірно вищий вміст АФА-позитивності порівняно з контрольною ( $P < 0,05$ ; таблиця). Результати свідчать про переважну  $\beta_2$ -GP1-залежність АФА у хворих на системний червоний вовчак, тоді як у групах з IVF і пацієнтів з гепатитом В вони були в більшості  $\beta_2$ -GP1-незалежними. Подібно до цих пацієнтів висока частота  $\beta_2$ -GP1-незалежних АФА реєструється при новоутвореннях, малярії та при сифілісі [7]. Також було показано, що АФА в сироватках крові хворих на вовчак переважно кофакторзалежні, натомість у пацієнток з IVF домінують кофакторнезалежні АФА (див. таблицю). Такі кофакторнезалежні АФА не є проявом аутоімунної реакції, можливо, це свідчення певного порушення імунорегуляції продукції кофакторнезалежних АФА. Нами було показано, що останні не асоціюються з тромботичними ускладненнями у пацієнток

**Антифосфоліпідні антитіла (АФА) та антитіла анти- $\beta_2$ -глікопротеїну-1 у сироватках пацієнтів різних клінічних груп**

Досліджувані групи	АФА (IgG до кардіоліпіну чи фосфатидилсерину)	Анти- $\beta_2$ -глікопротеїн-1-антитіла (IgG)	Кофакторзалежні АФА серед АФА позитивних зразків
Контроль	8 (6/71)	0 (0/71)	-
Запліднення <i>in vitro</i>	41 (42/102)	14 (5/35)	28 (4/14)
Системний червоний вовчак	63 (19/30)	47 (9/19)	80 (8/10)
Хронічний вірусний гепатит В	37,5 (12/32)	9 (3/32)	-

з IVF, проте вони суттєво знижують вірогідність імплантації ембріона при проведенні IVF [10]. З цієї причини система регуляції продукції кофакторнезалежних АФА викликає як науковий, так і практичний інтерес. Задля цього нами була досліджена система антифосфоліпідних АіАФА у різних клінічних групах.

АіАФА були виявлені в сироватках та IgG-фракціях сироваток крові людини. АіАФА з сироваток крові людини взаємодіють з іммобілізованими моноклональним АФА (рис. 1). Про специфічність саме до ідіотипу свідчить той факт, що ця взаємодія майже повністю блокується наявністю вільних моноклональних АФА в реакційному розчині, проте є нечутливою до наявності контрольних мишачих моноклональних антитіл (того самого субкласу та ізотипу) у розчині.

При проведенні функціонального тесту виявилось, що АіАФА з IgG-фракції сироватки крові людини та інтравенозного IgG не лише взаємодіють з ідіотипами моноклональних АФА, а й достовірно інгібують взаємодію моноклональних АФА та кардіоліпіну (в середньому на 18 %) [3]. Подібний інгібуючий ефект IgG-фракції сироватки людини мали і на аналогічну реакцію між афінно виділеними АФА людини та кардіоліпіном (в середньому на 27 %) [3].

Наявність АіАФА в сироватках здорових донорів при відсутності самих АФА на перший погляд видається нелогічною. Проте, якщо зробити припущення про фізіологічність продукції кофакторнезалежних АФА та існування жорсткого контролю цієї продукції з боку системи антиідіо-

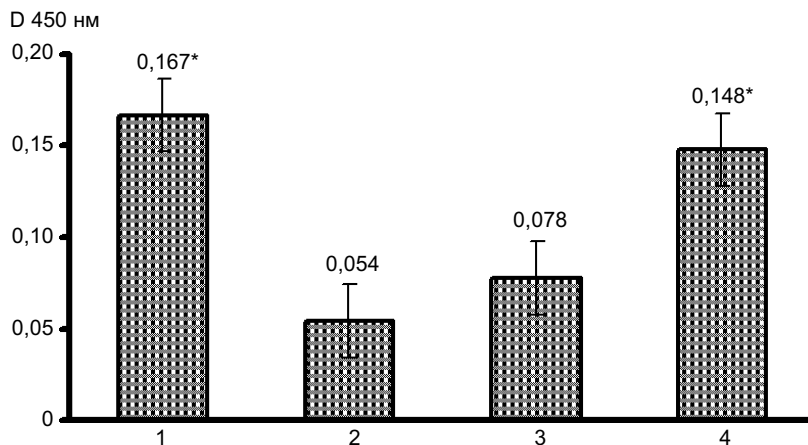


Рис. 1. Візуалізація антиідіотипових антитіл у сироватках крові людини (n=235) специфічних проти антифосфоліпідних антитіл (АФА) за взаємодією з моноклональним АФА. Лунки планшета покривали моноклональним АФА (варіанти 1, 3, 4) або контрольним антитілом (варіант 2) та інкубували з сироватками крові людини окремо (варіанти 1 і 2) та за наявності вільного моноклонального АФА 100 мкг/мл (варіант 3) або контрольного антитіла 100 мкг/мл (варіант 4) в інкубаційному розчині.

\*Достовірна відмінність значень у варіантах 1 та 4 від 2 та 3 (P<0,05)

типових антитіл, це стає більш зрозумілим. Можливо, наявність у нормі надлишку АіАФА над АФА призводить до знешкодження патогенетичних властивостей АФА та унеможлиблює їх детекцію в імуноферментному аналізі. Деякі літературні відомості також можуть бути використані як обґрунтування для цього припущення.

Про наявність кофакторнезалежних АФА чи В-лімфоцитів, специфічних до фосфоліпідних детермінант, свідчить можливість отримати з крові здорових донорів, негативних на АФА, гібридом, що продукують моноклональні кофакторнезалежні АФА [15]. Крім того, часто спостерігається швидка поява кофакторнезалежних АФА (IgG-класу) при гострих запаленнях, застосуванні гормонів та імуносупресивних препаратів, а також при СНІДі [1]. Відомо, що термічна обробка нормальних сироваток призводить до появи АФА [14]. Ці дані доводять існування АФА-специфічних клонів у нормі та наявність механізму специфічної супресії продукції АФА, яка втім порушується при певних імунодисрегуляторних станах. У більшості випадків таке порушення носить лише тимчасовий характер, і тоді АФА, що з'являються досить швидко зникають (так звані транзиторні кофакторнезалежні АФА). Однак,

можливо, при певних станах імунорегуляторні механізми супресування АФА-продукції не спрацьовують, і наявністю кофакторнезалежних АФА стає постійною (статусною). І, можливо, саме цей стан стає передумовою розвитку антифосфоліпідного синдрому надалі з продукцією вже кофакторзалежних АФА та тромботичними ускладненнями.

На роль потенційного механізму специфічної супресії АФА-відповіді найкраще підходять АіАФА. В літературі описаний протективний ефект моноклонального АіАФА щодо розвитку експериментального антифосфоліпідного синдрому у мишей [9]. Показана функціональна активність АіАФА, що проявляється в блокуванні ідіотипів АФА, є, можливо, фізіологічним значенням цих антитіл. Для перевірки цієї гіпотези нами було проведено дослідження вмісту АіАФА залежно від наявності або відсутності АФА в групі з IVF в, а також у пацієнтів, хворих на червоний вовчак і гепатит В. Наші результати показали, що АФА-позитивні IVF-пацієнтки мають достовірно нижчий вміст АіАФА в сироватці порівняно з АФА-негативними пацієнтками тієї самої групи ( $P < 0,05$ ; рис. 2). Це може свідчити про відсутність належної регуляції АФА-продукції з боку системи АіАФА у цих

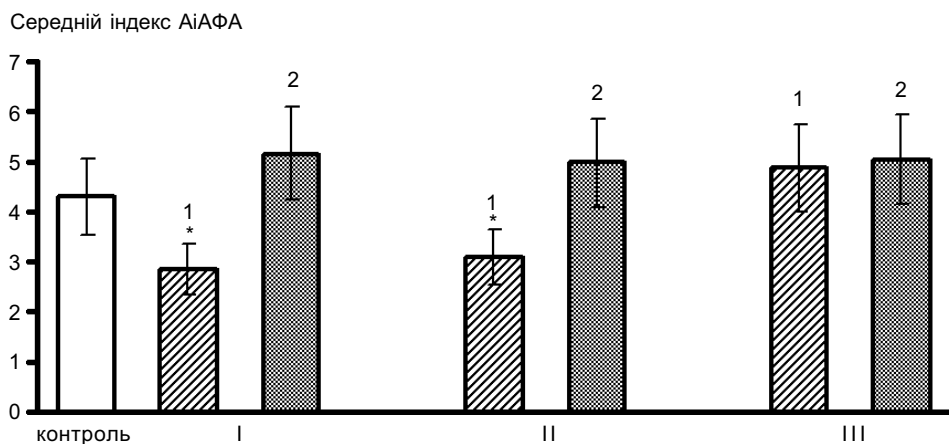


Рис. 2. Вміст антиідіотипових антитіл у сироватках крові пацієнтів з антифосфоліпідним антитілами (1) та без них (2) у досліджуваних клінічних групах. Контроль – здорові фертильні жінки ( $n = 65$ ); I – пацієнтки з безпліддям, що проходять лікування методом запліднення *in vitro* ( $n = 148$ ), II – хворі на хронічний вірусний гепатит В ( $n = 32$ ), III – хворі на системний червоний вовчак ( $n = 30$ ). \* достовірна різниця між пацієнтів групами з АФА та без них

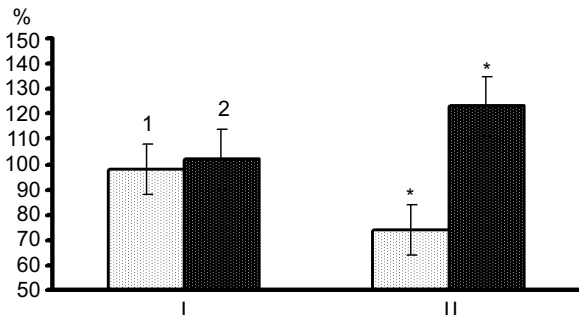


Рис. 3. Зміни вмісту антифосфоліпідних (1) і антиідіотипових антитіл (2) на 5-ту добу після інфузії інтравенозного IgG по відношенню до показників перед інфузією (значення через 5 днів після інфузії /значення до інфузії  $\times 100$  %): I – без інфузії (контроль  $n=11$ ); II – після інфузії інтравенозного IgG ( $n=18$ ).

\* достовірна відмінність від показників контрольної групи

пацієнток, наслідком чого і стає підвищення вмісту АФА. Цікаво, що така достовірна різниця вмісту АіАФА спостерігалася лише в групах, де АФА були переважно кофакторнезалежними (IVF і гепатит В), тоді як у сироватках пацієнтів з системним червоним вовчаком такої різниці не спостерігалася. Таким чином, можна припустити, що система АіАФА не має особливого значення у продукції “власне аутоімунних” кофакторзалежних АФА, специфічних до комплексних протеїнліпідних епітопів. Причиною цього може бути як висока гетерогенність ідіотипів кофакторзалежних АФА порівняно з кофакторнезалежними АФА, так і більш агресивний розвиток антитілопродукції при аутоімунному зриві

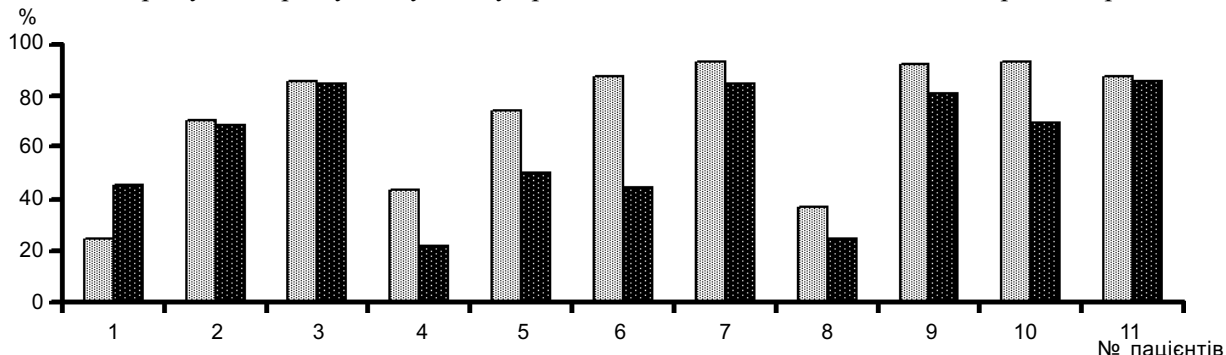


Рис. 4. Кореляція між зниженням вмісту антифосфоліпідних антитіл (АФА) під впливом інтравенозного IgG in vitro та in vivo. За всією ординат – відсоткове відношення вмісту АФА у зразках до та після інфузії  $r=0,77$ ,  $P<0,05$

Т-клітинної толерантності. У цьому аспекті було цікаво, який ефект на систему АФА – АіАФА може мати введення інтравенозного IgG, що містить донорські АіАФА.

Нами було показано, що інфузія інтравенозного IgG достовірно знижує вміст АФА та підвищує АіАФА в сироватках АФА-позитивних пацієнток з IVF ( $r=0,5$ ,  $P<0,05$ ; рис. 3). Кореляція свідчить, що згадані процеси взаємопов’язані, і система АіАФА відповідальна за зниження продукції кофакторнезалежних АФА у пацієнток з IVF внаслідок використання інтравенозного IgG.

Зниження вмісту АФА після інфузії інтравенозного IgG модулюється in vitro у зниженні цього показника в сироватках після інкубації з препаратом. Це зниження достовірно корелює зі зниженням вмісту АФА у сироватках пацієнток після інфузії інтравенозного IgG in vivo ( $r=0,7$ ,  $P<0,05$ ; рис. 4). Подібні результати фактично підтверджують значення АіАФА у системі контролю продукції кофакторнезалежних АФА.

## ВИСНОВКИ

1. АіАФА наявні в сироватках крові людини, імуноглобулінових їх фракціях і препаратах Ig для внутрішньовенного введення.

2. АіАФА специфічно визначаються в сироватках з “АФА-позитивних” і “АФА-негативних” пацієнтів. Вміст АіАФА в сироватках, пацієнтів з IVF і хворих на хронічний

гепатит В, позитивних на кофакторзалежні АФА, достовірно нижчий, ніж у “АФА-негативних” пацієнтів тієї ж клінічної групи.

3. Внутрішньовенне введення інтравенозного IgG “АФА-позитивним” пацієнтам призводить до достовірного зниження вмісту АФА та підвищення АіАФА. Ці зміни мають достовірну зворотну кореляцію.

4. Інкубація АФА-позитивної сироватки з препаратом інтравенозного IgG призводить до дозозалежного достовірного зниження вмісту АФА. Таке зниження вмісту АФА *in vitro* прямо корелює зі зниженням цього показника, яке спостерігається у пацієнтів після інфузії інтравенозного IgG.

**B.V. Donskoy, V.P. Chernyshov**

#### **ANTI-IDIOTYPIC ANTIBODIES AS A PHYSIOLOGICAL MECHANISM OF COFACTOR-INDEPENDENT ANTIPHOSPHOLIPID ANTIBODIES SUPPRESSION IN WOMEN SUBJECTED TO IVF**

Antiphospholipid antibodies (APA) and anti-idiotypic antiphospholipid antibodies (AiAPA) were studied in 148 women subjected to IVF. APA (IgG aCL, aPS<sub>1</sub>) levels in serum have been defined. Sera IgG fraction was also examined for the presence of AiAPA by three different methods: 1) binding of AiAPA with mouse monoclonal cofactor-independent APA (mAPA) immobilized on plate; 2) AiAPA neutralization of human affinity isolated APA and 3) mAPA binding with phospholipids. Significant difference in AiAPA levels between APA<sup>+</sup> and APA<sup>-</sup> women subjected to IVF have been found. The mean level of AiAPA was lower in APA<sup>+</sup> women subjected to IVF than in APA<sup>-</sup> women from the same group ( $p < 0,05$ ). IV infusion of Ig decreased the APA level significantly as well as increased the AiAPA level in APA<sup>+</sup> women subjected to IVF. Ig application to incubation *in vitro* results in decrease of APA levels in serum. Results of this study confirmed possibility of AiAPA participation in down regulation of cofactor-independent APA production in women undergoing to IVF.

*Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, Academy Medical Sciences of Ukraine, Kyiv*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

- Чернышов В.П., Дахно Ф.В., Донской Б.В., Сиренко В.Ю. Антифосфолипидные антитела и результаты оплодотворения *in vitro* // Здоровье женщины. – 2004. – 2, №18. – С. 137–139.
- Caruso A., Carolis S.D., Simone N.D. Antiphospholipid antibodies in obstetrics: new complexities and sites of action // Hum. Reprod. Update. – 1999. – 5. – P. 267–276.
- Donskoy B.V., Chernyshov V.P., Vodyanic M.A. Antiphospholipid antibodies and anti-idiotypic antiphospholipid antibodies in women undergoing IVF/ET // Amer. J. Reprod. Immunol. – 2004. – 51, №6 – P. 492.
- Geva E., Yaron Y., Lessing J.B. Circulating autoimmune antibodies may be responsible for implantation failure in *in vitro* fertilisation // Fertil. and Steril. – 1994. – 62. – P. 802–806.
- Gleicher N. Antiphospholipid antibodies and reproductive failure // Hum. Reprod. – 1997. – 12. – P. 13–16.
- Greaves M. Antiphospholipid antibodies and thrombosis // Lancet. – 1999. – 353. – P. 1348–1353.
- Hojnik M., Gilbert B., Ziporen L. ACA in infection are heterogenous in their dependency on b2GP1 // Lupus. – 1994. – 3. – P. 515–521.
- Kandiah D. A., Sali A., Sheng E.J. Current Insights into “Antiphospholipid” syndrome: Clinical, Immunological, and Molecular Aspects // Adv. Immunol. – 1998. – 70. – P. 507–562.
- Krause M., Blank Y., Levi T., Koike I. Anti-idiotypic immunomodulation of experimental anti-phospholipid syndrome via effect on Th1/Th2 expression // Clin. Exp. Immunol. – 1999. – 117. – P. 190–197.
- Kutteh W. H., Rote N.S., Silver R. Antiphospholipid antibodies and reproduction: the Antiphospholipid antibody syndrome // Amer. J.Reprod. Immunol. – 1999. – 41. – P. 133–151.
- Landenberg C., Lackner K.J., Landenberg P. et al. Antiphospholipid antibodies, Isolation and characterization of two human monoclonal APL IgG from patients with autoimmune disease // J.Autoimmun. – 1999. – 13. – P. 215–223.
- Larranaga G.F., Forastiero R.R., Carreras L.O. Different types of APA in AIDA a comparison with siphilis and APS // Thromb Res. – 1999. – 96. – P. 19–25.
- Levine J.S., Subang R., Koh J.S., Rauch J. Induction of APA by b2-glicoprotein I bound to apoptic thimocytes // J.Autoimmun. – 1999. – 4. – P. 124–126.
- McIntyre J.A., Wagenknecht D.R., Triplett D.A. Detection of APA in heat inactivated normal human sera // Thromb. Res. – 1993. – 69. – P. 489–490.
- Shan H., Goldman J., Cunto G. Heterogeneity of APA and anti-endothelial cell antibodies // J.Autoimmun. – 1998. – 11. – P. 651–660.

*Ин-т педіатрії, акушерства та гінекології АМН України, Київ*

*Матеріал надійшов до редакції 21.09.2005*