

О.В.Козина¹, Л.М.Огородова², Е.А.Геренг², И.В.Петрова², А.Э.Сазонов², В.А.Егоров³, Е.В.Комякова¹

Вклад токсических метаболитов оксида азота в формирование эозинофильного воспаления при бронхиальной астме

1 – Центр по профилактике и борьбе со СПИД и ИЗ: 683000, Петропавловск-Камчатский, Ленинградский пр-т, 114;

2 – Сибирский государственный медицинский университет: 634050, Томск, Московский тракт, 2;

3 – Камчатский областной онкологический диспансер: 683024, Петропавловск-Камчатский, ул. Лукашевского, 15

O. V. Kozina, L. M. Ogorodova, E. A. Gereng, I. V. Petrova, A. E. Sazonov, V. A. Egorov, E. V. Komyakova

A role of cytotoxic NO metabolites for eosinophilic inflammation in bronchial asthma

Summary

The purpose of the study was to estimate contribution of NO metabolites to development of morphological patterns of airway inflammation in bronchial asthma. Microscopic examination of bronchial biopsy specimens and measurement of nitrite anion, 3-nitrotyrosine, IL-8, IL-4 and INF- γ levels in bronchial washouts were performed in 38 adults with mild and severe asthma. In patients with severe asthma, concentration of 3-nitrotyrosine reversely correlated with volumetric density of ciliary cells and eosinophil number in cellular infiltrate. One-way variability of nitrite anion and IL-8 levels in bronchial washouts and of neutrophil number in the bronchial wall was established in severe asthma. High level of nitrite anion, IL-8 and selective accumulation of neutrophils in the airways in severe asthma was associated with reduced volumetric density of the whole epithelium, significant thickness of the basement membrane, increased portion of the connective tissue and decreased portion of the glandular tissue.

Key words: bronchial asthma, bronchial biopsy, bronchial washout, 3-nitrotyrosine, nitrite-anion cytokines, inflammation.

Резюме

Цель исследования состояла в оценке участия метаболитов оксида азота в формировании морфологических паттернов воспаления дыхательных путей при бронхиальной астме (БА). У 38 больных легкой и тяжелой БА проведено цитологическое и морфометрическое исследование бронхобиоптатов и изучено содержание нитритов, 3-нитротирозина, интерлейкинов 8 и 4 (IL-8, IL-4), интерферона- γ в бронхиальном смыве (БС). У больных тяжелой БА содержание 3-нитротирозина в БС отрицательно коррелирует с объемной плотностью реснитчатых эпителиоцитов и числом эозинофилов в клеточном инфильтрате. Установлена однонаправленность вариабельности уровней нитрит-аниона, IL-8 в БС и числа нейтрофилов в бронхобиоптате при тяжелой БА. Высокое содержание нитрит-аниона, IL-8 и избирательное накопление нейтрофилов в дыхательных путях при тяжелой БА ассоциировано со снижением объемной плотности всего покровного эпителия, утолщением базальной пластинки, увеличением объема соединительной и снижением доли железистой ткани.

Ключевые слова: бронхиальная астма, бронхобиоптаты, бронхиальный смыв, 3-нитротирозин, нитрит-анион, цитокины, воспаление.

По современным представлениям, воспаление дыхательных путей является основным морфологическим признаком бронхиальной астмы (БА), определяющим ее клинико-функциональные проявления [1]. Так, при исследовании бронхиального лаважа и бронхобиоптатов больных с разными клиническими формами БА выявлены некоторые различия в морфологической картине воспаления [2]. Можно предположить, что основа этой гетерогенности связана с особенностями образования провоспалительных медиаторов у разных групп больных, что приводит к развитию воспалительных реакций с преимущественным участием тех или иных эффекторных клеток. В последние годы большое внимание уделяется исследованию роли оксида азота (NO) и продуктов его метаболизма в аллергическом воспалении и бронхоконстрикции [3–5].

Целью настоящего исследования была оценка вклада метаболитов NO в формирование морфологических особенностей воспаления при тяжелой БА.

Материалы и методы

В исследовании участвовали 38 больных БА (средний возраст – $48,92 \pm 2,41$ года), подавляющее большинство из которых составили женщины (74,0 %).

Диагноз и тяжесть заболевания определяли в соответствии с рекомендациями международного согласительного документа GINA [1].

Критерии включения были следующими: амбулаторные и стационарные пациенты в возрасте 19–60 лет с ранее подтвержденным диагнозом БА; положительные результаты кожных прик-тестов с ≥ 1 аэроаллергеном; провокационная концентрация, вызывающая падение объема форсированного выдоха за 1-ю с (ОФВ₁) на 20 % (ПК₂₀) в метахолиновом тесте ≤ 8 мг/мл; отсутствие соответствующей тяжести заболевания терапии в течение последнего месяца; отсутствие острых респираторных заболеваний, а также обострений БА в течение предшествующих 4 нед. Пациенты должны были правильно пользоваться ингалятором, пикфлоуметром, адекватно оценивать свое состояние, а также своевременно и правильно заполнять дневники самоконтроля (значения пиковой скорости выдоха (ПСВ) утром и вечером; оценка дневных и ночных симптомов).

Специальные исследования бронхобиоптатов и содержимого бронхиального смыва (БС) были проведены не ранее чем через 3 мес. с момента последнего обострения БА. Процедура проводилась после 3-месячного курса базисной противовоспалительной

терапии в объеме, соответствующем рекомендациям GINA пересмотра 2006 г. [1]. Бронхоскопическое исследование выполнено всем пациентам в стационаре.

Бронхоскопию проводили в утренние часы натощак под местной анестезией 10%-ным раствором лидокаина. Вводили 150 мл стерильного, предварительно подогретого до 37 °С физиологического раствора через сегментарный или субсегментарный бронх дробно по 20–60 мл и далее полностью аспирировали, получая порцию БС. Полученные БС были разделены на аликвоты и помещены на хранение в сосуд Дьюара для последующего одновременного определения метаболитов. Измерение изучаемых показателей проводили в супернатанте БС (нитриты, цитокины, 3-нитротирозин [3-НТ]). Бронхиопат получали методом щипковой биопсии из среднедольного бронха правого легкого. Бронхиопаты помещались в 10%-ный нейтральный забуференный формалин, проводились по спиртам и заливались в парафин по стандартной методике. Гистологические препараты окрашивались гематоксилином и эозином.

Содержание интерлекинов 4 и 6 (IL-4, IL-8), интерферона- γ (INF- γ) в БС определяли иммуферментным методом с использованием наборов фирм "Вектор-Бест" (Новосибирск). Оценку в БС уровня нитрит-аниона проводили по реакции с реактивом Грисса [6], 3-НТ – по реакции в кислой среде [7]. Уровень сывороточного общего IgE определяли в ходе 1-стадийного (*sandwich*) твердофазного иммуноферментного анализа посредством тест-систем "Диалюс" (Roche, Швейцария).

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью пакета программ *Statistica 6.0* (Stat Soft, США). Вариационные ряды анализировали по методам описательной статистики, вычисляя среднее значение (M) и ошибку среднего (m), медиану, стандартное отклонение. При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых выборках гипотезу о равенстве средних выборочных величин проверяли посредством t -критерия Стьюдента. Для оценки статистической значимости различий показателей выборок, не подчиняющихся закону нормального распределения, использовали U -тест Манна–Уитни. С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Исследование проведено по протоколу № 383, утвержденному на заседании локального комитета по этике ГОУ ВПО "Сибирский государственный медицинский университет Росздрава" 31.01.06. Все больные подписали информированное согласие до включения в исследование.

Результаты и обсуждение

По результатам клинико-функционального обследования, а также на основании изучения анамнеза и результатов мониторинга течения болезни в течение 2 нед. после включения в исследование у 8

Таблица 1
Клинико-функциональная характеристика обследованных групп пациентов

Показатели	Легкая БА (n = 8)	Тяжелая БА (n = 30)
Средний возраст, лет	41,75 ± 7,46	50,83 ± 2,28
Мужчины	5	5
Женщины	3	25
Длительность заболевания, лет	14,62 ± 3,56	14,67 ± 1,88
Возраст дебюта заболевания, лет	27,12 ± 6,83	36,29 ± 2,47
ОФВ ₁ , % _{доп.}	84,5 ± 1,94	58,87 ± 2,29**
ФЖЕЛ, % _{доп.}	89,22 ± 2,04	78,24 ± 3,20***
Утренние значения ПСВ, %	85,22 ± 1,39	58,59 ± 2,63**
Дневные симптомы, баллы*	0,23 ± 0,04	4,05 ± 0,33**
Ночные симптомы, баллы*	0,017 ± 0,009	2,04 ± 0,16**
Потребность в препаратах скорой помощи, число ингаляций в сутки	0,06 ± 0,01	8,08 ± 1,00**
Обострения, число всех случаев в год	0,33 ± 0,02	9,2 ± 0,9**
IgE, МЕ/мл	466,37 ± 210,27	172,09 ± 26,43

Примечание: * – оценка по 5-балльной шкале симптомов; ** – $p < 0,0001$ по сравнению с пациентами с легкой БА; *** – $p = 0,04916$ по сравнению с пациентами с легкой БА.

больных диагностирована легкая БА, у 30 – тяжелая (табл. 1).

При включении в исследование у пациентов с тяжелой БА отмечены выраженная тяжесть симптомов, низкие показатели функции легких, значительное число обострений и большая частота применения терапии скорой помощи. таких больных отличало использование системных кортикостероидов на протяжении не менее 6 мес. до исследования и в течение самого исследования.

Известно, что в результате персистирующего воспаления при БА формируются специфические морфологические изменения тканей стенки бронхов, в рамках которых регистрируются процессы ремоделирования, составляющие патогенетическую основу неконтролируемого течения заболевания. Большое научное и практическое значение имеет выяснение механизмов ремоделирования, в частности участие метаболитов NO в развитии патологических тканевых изменений.

При легкой форме заболевания эндоскопическая картина укладывалась в рамки умеренного, ограниченного, катарального эндобронхита, при тяжелой степени бронхиальной астмы в бронхах выявлялись признаки выраженного, диффузного, катарально-склеротического эндобронхита. Несмотря на предшествующую процедуру бронхобиопсии контролирующую терапию, при морфологическом исследовании бронхобиоптатов у всех включенных пациентов установлены такие изменения, как отек и венозное полнокровие сосудов, очаговая полиморфноклеточная инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки, дистрофия бронхиального эпителия и участки десквамации эпителия.

Вместе с тем выявлены различия в результатах цитологического и морфометрического исследования

бронхиобиптатов больных. Так, отличительным признаком легкой БА была большая плотность эозинофильной инфильтрации слизистой (рис. 1).

Установлены достоверное утолщение базальной мембраны и полиморфноклеточная инфильтрация воздухоносных путей при тяжелой БА (рис. 2).

Как видно из табл. 2, в слизистой оболочке бронхов у всех больных БА на фоне снижения числа реснитчатых и бокаловидных клеток нарушено соотношение этих эпителиоцитов (в норме 4 : 1 соответственно).

Анализ морфометрических данных продемонстрировал у больных легкой БА сохранность эпителиального пласта и железистой ткани, высокую плотность реснитчатых и базальных эпителиоцитов. В слизистой оболочке бронхов пациентов, страдающих тяжелой БА, наблюдалось значимое снижение объемной плотности покровного эпителия с одновременным уменьшением общего числа реснитчатых и базальных клеток в сравнении с легкой формой болезни ($p < 0,00001$). При тяжелой БА уменьшение плотности эпителия сочеталось со снижением высоты эпителиального пласта, значительным утолщением базальной пластинки (в 2 раза), высоким объемом соединительной и снижением доли железистой ткани (в 2 раза).

Соотношение степени инфильтрации слизистой оболочки бронхов эффекторными клетками (эозинофилами / нейтрофилами) было различным, как показано в табл. 2. При легкой форме заболевания преобладали эозинофилы. Напротив, при количественном подсчете плотности клеточного инфильтрата в 1 мм² ткани бронхов у больных тяжелой БА было больше нейтрофилов, лимфоцитов и макрофагов. При этом уровень эозинофилов был повышен, но не доминировал в клеточном инфильтрате. Недавние исследования патоморфологической характеристики тяжелой БА (*brittle*) также показали преобладание в составе инфильтрата слизистой оболочки бронхов гистиомакрофагальных элементов, лимфоцитов, ней-

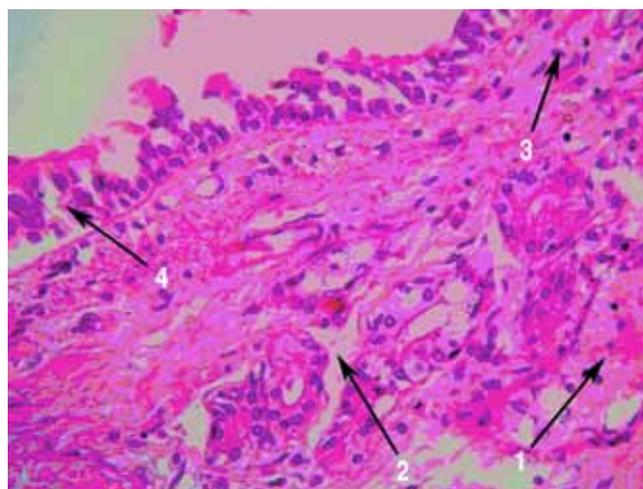


Рис. 1. Биоптат слизистой оболочки бронхов больного N. с БА легкой степени тяжести. Венозное полнокровие (1) и отек подслизистого слоя (2), эозинофильный гранулоцит (3), очаговая десквамация эпителия (4). Окраска гематоксилином и эозином; $\times 400$

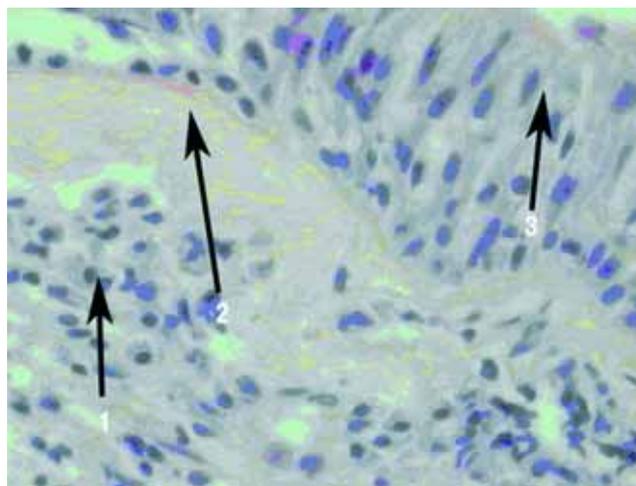


Рис. 2. Бронхиобиптат слизистой оболочки пациента M. с тяжелой БА. Полиморфноклеточный инфильтрат собственной пластинки слизистой оболочки (1), выраженное утолщение и разволокнение базальной мембраны (2), бронхиальный эпителий с признаками дистрофии (3). Окраска гематоксилином и эозином; $\times 640$

трофилов при тяжелой БА на фоне относительно более небольшого, по сравнению с легкой формой заболевания, количества эозинофилов [8].

Таким образом, у больных с разной степенью тяжести БА установлены отличительные паттерны воспаления с преимущественным участием тех или иных эффекторных клеток, характеризующиеся наличием (при тяжелой БА) или отсутствием (при легкой БА) выраженных признаков ремоделирования тканей стенки бронхов, что и составляет основу клинического полиморфизма БА.

Таблица 2
Морфометрические и цитологические показатели слизистой оболочки бронхов обследованных групп пациентов

Исследуемые параметры	Легкая БА, n = 8	Тяжелая БА, n = 30
Объемная плотность всего покровного эпителия, мм ³ / мм ³	0,28 ± 0,05	0,16 ± 0,017*
Объемная плотность реснитчатых эпителиоцитов, мм ³ / мм ³	0,11 ± 0,01	0,059 ± 0,01*
Объемная плотность бокаловидных эпителиоцитов, мм ³ / мм ³	0,040 ± 0,002	0,04 ± 0,005
Объемная плотность базальных эпителиоцитов, мм ³ / мм ³	0,110 ± 0,014	0,05 ± 0,005*
Соотношение реснитчатых / бокаловидных эпителиоцитов	2,75 / 1	1,48 / 1
Относительный объем желез, %	76,35 ± 2,41	30,73 ± 3,85*
Относительный объем соединительной ткани, %	23,42 ± 2,41	61,80 ± 3,50*
Высота эпителиального пласта, мкм	60,67 ± 14,84	36,91 ± 4,06*
Толщина базальной мембраны, мкм	9,42 ± 4,77	20,79 ± 1,59*
Плотность макрофагов в 1 мм ²	31,50 ± 5,55	46,97 ± 4,01**
Плотность лимфоцитов в 1 мм ²	33,57 ± 2,57	57,21 ± 3,26***
Плотность нейтрофилов в 1 мм ²	11,68 ± 2,86	54,66 ± 3,15*
Плотность эозинофилов в 1 мм ²	45,40 ± 0,81	11,24 ± 1,73*

Примечание: * – $p < 0,00001$ по сравнению с пациентами с легкой БА; ** – $p = 0,0406$ по сравнению с пациентами с легкой БА; *** – $p = 0,0002$ по сравнению с пациентами с легкой БА.

Таблица 3
Содержание цитокинов в БС у больных БА

Исследуемые показатели	Легкая БА, n = 8	Тяжелая БА, n = 30
IL-4, пг/мл	21,95 ± 5,84	147,29 ± 25,31*
INF-γ, пг/мл	5,83 ± 1,24	97,58 ± 12,68**
IL-4 / INF-γ	3,54 ± 0,24	1,47 ± 0,12**
IL-8, пг/мл	171,94 ± 50,75	330,98 ± 28,57***

Примечание: * – $p = 0,0005$ по сравнению с пациентами с легкой БА; ** – $p < 0,00001$ по сравнению с пациентами с легкой БА; *** – $p = 0,0239$ по сравнению с пациентами с легкой БА.

Воспаление дыхательных путей является чрезвычайно сложным по происхождению, регуляции, исходам и представляет собой каскад процессов с участием многих клеток и медиаторов [1]. Важное место среди них занимает участие NO и его метаболитов. Каков механизм участия токсических метаболитов в патологических тканевых процессах при БА? Результаты исследования уровня провоспалительных медиаторов в бронхиальных смывах больных БА представлены в табл. 3.

Сравнительный анализ содержания цитокинов в бронхиальных смывах позволил установить преобладание Th2-ассоциированного воспаления (Th2 – Т-хелперные клетки II типа), о котором судили по соотношению IL-4 / INF-γ. Выявлены существенные различия уровня провоспалительных медиаторов в зависимости от тяжести БА. Как видно из табл. 3, содержание IL-4, INF-γ и IL-8 при тяжелой БА значимо превышало результаты, зарегистрированные при легкой форме заболевания (в 6,7; 7,1 и 7,4 раза соответственно). Полученные данные соответствуют концепции более выраженного воспаления, характеризующего тяжелую БА.

Это касается и таких провоспалительных маркеров, как NO и его метаболиты. В ходе исследования были получены данные, подтверждающие интенсивную продукцию метаболитов NO (3-НТ и нитритов) при тяжелой БА (табл. 4). Такой результат не противоречит известным фактам, свидетельствующим, что интенсивность продукции NO напрямую связана с выраженностью воспаления в тканях бронхов при БА [3–5].

Зарегистрировано значительное более высокое содержание 3-НТ в БС больных тяжелой БА в сравнении с легкой, причем уровень 3-НТ у пациентов как с легкой, так и с тяжелой БА в несколько раз превышал общее количество нитрит-аниона в БС (табл. 4).

Чтобы выяснить, какое значение имеет столь интенсивное образование токсических метаболитов NO в дыхательных путях при БА, была изучена взаи-

Таблица 4
Содержание нитритов и 3-НТ в БС у больных БА

Исследуемые показатели	Легкая БА, n = 8	Тяжелая БА, n = 30
Нитриты, мкМ	1,62 ± 0,41	6,57 ± 1,52*
3-НТ, мМ	4,81 ± 0,79	204,30 ± 40,06**

Примечание: * – $p = 0,041$ по сравнению с пациентами с легкой БА; ** – $p = 0,0093$ по сравнению с пациентами с легкой БА.

Таблица 5
Значимые корреляционные связи уровня цитокинов, 3-НТ, нитрит-аниона и морфометрических данных слизистой оболочки бронхов больных БА

Сопоставляемые показатели	Коэффициент корреляции Спирмена, значимость	
	Легкая БА, n = 8	Тяжелая БА, n = 30
IL-8 / объемная плотность всего покровного эпителия		$r = -0,805118$; $p = 0,015905$
IL-8 / нитрит-анион		$r = 0,448529$; $p = 0,048000$
Нитрит-анион / плотность нейтрофилов		$r = 0,90$; $p = 0,037400$
Нитрит-анион / IL-4 / INF-γ	$r = 0,75450$; $p = 0,03513$	
3-НТ / плотность эозинофилов		$r = -0,849398$; $p = 0,007604$
3-НТ / объемная плотность реснитчатых эпителиоцитов		$r = -0,922172$; $p = 0,001111$

мосвязь иммунологических показателей, уровня 3-НТ, нитрит-аниона и морфометрических данных (табл. 5).

Результаты корреляционного анализа указывают на однонаправленность вариабельности таких маркеров, как нитрит-анион, IL-8 и количество нейтрофилов в бронхобиоптатах при тяжелой БА (табл. 5). Так, содержание нитрит-анионов прямо коррелирует с плотностью нейтрофилов в бронхиальной стенке и с уровнем IL-8. Повышение IL-8, в свою очередь, приводит к уменьшению объемной плотности покровного эпителия. Это свидетельствует о том, что в условиях длительного, интенсивного воспаления с участием нейтрофилов в дыхательных путях при тяжелой БА развивается выраженный окислительный стресс, сопровождающийся, как было указано выше (табл. 4), образованием экстремально высоких концентраций токсичного 3-НТ.

В соответствии с результатами корреляционного анализа (табл. 5) накопление 3-НТ в дыхательных путях ассоциировано со снижением плотности эозинофилов ($r = -0,849$; $p = 0,007$) и объемной плотности реснитчатых эпителиоцитов ($r = -0,922$; $p = 0,001$). Клетки покровного эпителия участвуют в образовании про- и противовоспалительных медиаторов, конститутивно экспрессируют матричную РНК IL-5 и продуцируют IL-5. Недавно опубликованные результаты экспериментальных исследований указывают на то, что снижение аффинности рецептора к IL-5 на поверхности эпителиальных клеток бронхов при деструкции последних [9, 10] приводит к задержке миграции эозинофилов в слизистую бронхов тем более значимой, чем выше уровень 3-НТ в дыхательных путях.

Заключение

Вероятно, образование высоких концентраций токсического 3-НТ в дыхательных путях при тяжелой БА является механизмом формирования особого морфологического паттерна воспаления, основанным на торможении миграции эозинофилов. Дополнительно

образование высокого уровня нитрит-анионов, IL-8 и избирательное накопление нейтрофилов в дыхательных путях при тяжелой БА, ассоциированное со снижением объемной плотности всего покровного эпителия, связано с признаками ремоделирования бронхиальной стенки, такими как значительное утолщение базальной мембраны (в 2 раза), увеличение объема соединительной и снижение доли железистой ткани.

Литература

1. Global Initiative for Asthma. NIH publication number 01-3659, NHLBI / WHO 2004; National Institutes of Health.
2. Wenzel S.E. Asthma: defining of persistent adult phenotypes. *Lancet* 2006; 368: 804–813.
3. Dweik R.A., Comhair A.A., Gaston B. et al. NO chemical events in the human airway during the immediate and late antigen-induced asthmatic response. *Pros. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98 (5): 2622–2627.
4. Ricciardolo L.M., Sterk P.J., Gaston B., Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol. Rev.* 2004; 84: 731–765.
5. Козина О.В., Огородова Л.М., Андрушкевич В.В. и др. Метаболиты оксида азота и их значение в патогенезе бронхиальной астмы. *Клин. лаб. диагн.* 2008; 2: 52–57.
6. Звягина Т.В., Белик И.Е., Аникеева Т.В. и др. Методы изучения метаболизма оксида азота. *Вестн. гиг. и эпидемиол.* 2001; 5 (2): 253–257.
7. Каминская Л.Ю., Жлоба А.А., Александрова Л.А. и др. Влияние донатора NO нитрозотиола глутатиона на уровень окислов азота и малонового диальдегида в крови крыс. *Артер. гипертенз.* 2005; 11 (1): 30–34.
8. Огородова Л.М., Селиванова П.А., Геренг Е.А. и др. Патоморфологическая характеристика нестабильной бронхиальной астмы (фенотип brittle). *Тер. арх.* 2008; 3: 37.
9. Сазонов А.Э., Иванчук И.И., Огородова Л.М. и др. Антагонистические эффекты изоформ рецептора интерлейкина-5 при бронхиальной астме. *Мед. иммунол.* 2004; 6 (1–2): 121–126.
10. Огородова Л.М., Сазонов А.Э., Иванчук И.И., Капилевич Л.В. Интерлейкин-5 и бронхиальная астма / Под ред. А.Г.Чучалина. Томск: Изд-во Томск. ун-та; 2006. 172 с.

Информация об авторах

Козина Ольга Владимировна – к. м. н., врач клинической лабораторной диагностики; тел.: (4152) 42-17-22; e-mail: ovkozina2006@rambler.ru
 Огородова Людмила Михайловна – д. м. н., проф., член-корр. РАМН проректор по НР и ПП СибГМУ, зав. кафедрой факультетской педиатрии с курсом детских болезней; тел.: +7-3822-53-23-04; e-mail: lm-ogorodova@mail.ru
 Геренг Елена Андреевна – к. м. н., старший научный сотрудник ЦНИЛ СибГМУ, старший преподаватель кафедры морфологии и общей патологии медико-биологического факультета СибГМУ; тел.: (3822) 52-99-16; e-mail: e-gereng@mail.ru
 Сазонов Алексей Эдуардович – д. м. н., зав. отделом биохимии и спектрального анализа ЦНИЛ СибГМУ; тел.: (3822) 52-99-16; e-mail: biotech@ssmu.net.ru
 Петрова Ирина Валерьевна – к. м. н., старший научный сотрудник ЦНИЛ СибГМУ; тел.: (3822) 52-99-16; e-mail: irinavall@mail.ru
 Егоров Владимир Александрович – врач-эндоскопист Камчатского областного онкологического диспансера; тел.: (4152) 23-62-16
 Комякова Елена Викторовна – врач-аллерголог Центра по профилактике и борьбе со СПИД и ИЗ; тел.: (4152) 42-63-39

Поступила 18.02.09

© Коллектив авторов, 2009

УДК [616.248-06:616-008.853.5]-092