

МОНИТОРИНГ НЕЙРОМЕДИАТОРА СЕРОТОНИНА ПРИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕВЫХ БОРРЕЛИОЗАХ

Сумливая О.Н., Каракулова Ю.В., Воробьева Н.Н.

ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, 614990, Пермь, Россия

В работе представлены результаты изучения количественного содержания серотонина тромбоцитов крови, эмоционального статуса и степени астении у 45 больных в остром периоде иксодовых клещевых боррелиозов (27 пациентов с локализованной и 18 – с диссеминированной стадией). Контрольную группу составили 20 здоровых лиц. Исследование серотонина проводили методом иммуноферментного анализа. В разгар заболевания установлено достоверное снижение данного показателя относительно контрольных значений. В период ранней реконвалесценции уровень тромбоцитарного серотонина в группе больных боррелиозами имел тенденцию к повышению, однако еще не достигал уровня его концентрации в группе контроля. Количество тромбоцитарного серотонина имело отрицательную корреляционную связь с уровнем реактивной тревожности по опроснику Spielberger–Ханина. Исследование нейротрансмиттера серотонина у больных клещевыми боррелиозами позволяет оценить возможную степень потенциального повреждения нервной ткани, его вовлеченность в формирование тревожно-депрессивных проявлений и требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: тромбоцитарный серотонин; иксодовые клещевые боррелиозы.

MONITORING OF NEUROTRANSMITTER SEROTONIN IN IXODID TICK BORRELIOSIS

Sumlivaya O.N., Karakulova Yu.V., Vorobyeva N.N., E.A. Vagner Perm State Medical Academy, 614990, Perm, Russia

The study presents the results of measurement of platelet serotonin level and estimation of emotional status and degree of asthenia in 45 patients in acute period of Ixodid tick borreliosis (27 patients with local and 18 - with disseminated forms). Twenty (20) healthy subjects consisted control group. Serotonin level was measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Significant decrease of serotonin level at the height of disease was seen in patient group compared to the control group. During the early recovery stage the platelet serotonin level in the group of patients with borreliosis only had the trend to increase, but still remained lower than in control group. We revealed negative correlation between platelet serotonin level and reactive anxiety assessed with Spielberger-Hanin questionnaire. The assessment of platelet serotonin level in patients with Ixodid tick borreliosis can suggest the severity of potential nervous tissue damage and involvement of serotonin in genesis of anxiety and depressive symptoms. This question should be investigated further.

К e y w o r d s : platelet serotonin; Ixodid tick borreliosis.

Иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) – трансмиссивные природно-очаговые инфекции с острым и хроническим течением, при которых возможны поражения кожи, нервной и сердечно-сосудистой систем, печени, опорно-двигательного аппарата [1]. Возбудителем являются боррелии комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato*, передающиеся иксодовыми клещами. История изучения клещевых боррелиозов насчитывает уже более 30 лет, но с каждым годом усиливается интерес к проблемам этих ин-

фекций, обусловленный их широким распространением, нередко тяжелым течением и возможностью формирования хронических форм. На территории Пермского края существуют активные природные очаги клещевых боррелиозов [2]. Показатель заболеваемости в 2012 г. составил 12,9 на 100 тыс. населения, что в 2 раза выше среднероссийского. Только в Перми ежегодно регистрируется более 400 случаев инфекции.

Несмотря на значительные успехи в области изучения ИКБ, целый ряд аспектов остается недостаточно исследованным. До настоящего времени не определена роль серотонинергической системы при ИКБ, хотя известно, что она активно включается в механизм развития различных заболеваний нервной системы [3–6]. В этой связи представляется актуальным изучение состояния гуморальной серотониновой системы у больных боррелиозами.

Серотонин (5-гидрокситриптамин, 5-НТ) – биогенный амин, который действует как нейромедиатор во многих отделах центральной нервной системы (ЦНС) и периферической нервной системы. Он участвует в реализации ряда функций: влияет на познавательную способность, возникновение тревоги, беспокойства, агрессии, боли, регулирует пищевое поведение, сексуальную активность, сон и другие

Сведения об авторах:

Сумливая Ольга Николаевна – канд. мед. наук, доц. каф. инфекционных болезней ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, 614990, Пермь, ул. Петропавловская, 26; e-mail: son-2005@yandex.ru

Каракулова Юлия Владимировна – д-р мед. наук, проф. каф. неврологии ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, 614990, Пермь, ул. Петропавловская, 26; e-mail: julia.karakulova@mail.ru

Воробьева Наталья Николаевна – д-р мед. наук, проф., зав. каф. инфекционных болезней ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, 614990, Пермь, ул. Петропавловская, 26; e-mail: infect-perm@mail.ru

ритмы [7–10]. Серотонин также рассматривается как гормон, цитокин, биологический модификатор, фактор роста, регулятор тонуса сосудов и кишечной активности [10]. Он находится в серотонинергических нейронах ЦНС и на периферии в тромбоцитах, тучных клетках, а его высвобождение происходит при повреждении тканей.

Одной из моделей изучения функционирования серотониновой системы является исследование тромбоцитарного серотонина (ТС). Экспериментальным путем установлено, что содержание серотонина в плазме весьма лабильно и быстро реагирует на введение агентов, влияющих на его метаболизм. Вместе с тем доказано, что уровень серотонина в тромбоцитах более стабилен и может изменяться лишь в результате длительных воздействий [9].

Проведенные генетические исследования показали кодирование структуры тромбоцитарного и нейронального серотонинового транспортера одним и тем же геном, что, вероятно, связано с общим эмбриональным происхождением этих двух различных типов клеток [9]. Изложенные факты, а также идентичность рецепторов тромбоцитов и серотонинергических нейронов легли в основу теории о сходстве системы тромбоциты – плазма с системой пресинаптические окончания – экстрацеллюлярная жидкость [5]. В связи с этим тромбоцит представляет собой доступную и адекватную модель серотониновой системы ЦНС, наиболее часто используемую в исследованиях.

Для измерения концентрации серотонина применяется ряд современных биохимических и иммунохимических методов, пришедших на смену недостаточно чувствительному колориметрическому определению. К ним относятся высокоэффективная жидкостная и газовая хроматография с различными видами детекции, радиоиммунологический и иммуноферментный тесты. В большинстве исследований концентрация серотонина определяется с помощью хроматографических методов, точных и высокочувствительных. Однако они дорогостоящи и достаточно сложны, что ограничивает внедрение их в практику. Появление метода иммуноферментного анализа (ИФА), не уступающего по чувствительности и специфичности рутинным тестам [11], сделало возможность проводить исследование концентрации серотонина более доступной.

Определение серотонина с помощью ИФА имеет ряд особенностей вследствие того, что специфические высокоаффинные антитела удается получить только к молекулам ацилированных производных нейротрансмиттера. Поэтому перед исследованием необходимо подвергнуть биологические образцы дополнительной обработке, включающей экстракцию, ацилирование и гидролиз. Появление усовершенствованных модификаций этого метода открыло перспективу их широкого внедрения в лабораторную диагностику.

Целью исследования явилось изучение количественного содержания серотонина в тромбоцитах

крови, степени астении и эмоционального статуса у больных ИКБ.

Пациенты и методы исследования

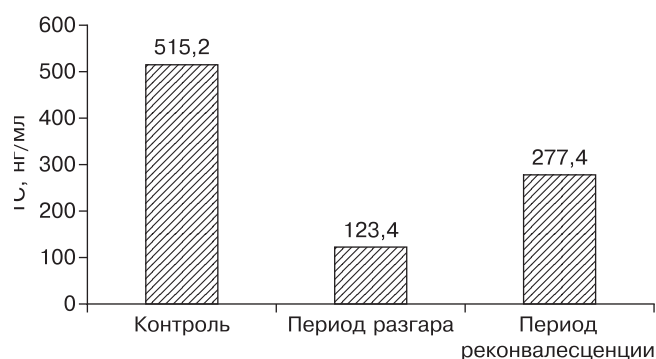
Обследовано 45 больных в раннем периоде ИКБ, находившихся на лечении в Пермской краевой клинической инфекционной больнице (20 мужчин и 25 женщин в возрасте от 21 года до 78 лет). Больные были разделены на 2 группы в зависимости от стадии заболевания. Первая группа включала 27 пациентов с локализованной стадией (эритемная форма), 2-я – 18 больных с диссеминированной стадией (эритемная и безэритемная формы). Контрольную группу составили 20 здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту.

Диагноз ИКБ устанавливали на основании эпидемиологических (присасывание клеща или посещение леса в сроки, соответствующие инкубационному периоду), клинических (наличие эритемы в месте присасывания клеща, общеинфекционного синдрома, поражения внутренних органов и систем) и серологических данных (обнаружение в сыворотке крови специфических IgM к антигену боррелий).

Концентрацию ТС крови у 35 больных определяли методом твердофазного ИФА с использованием набора Serotonin ELISA Fast Track (LDN, Германия). Исследование выполняли в периоды разгара (1–2-й день болезни) и ранней реконвалесценции (при выписке из стационара). У больного с ИКБ утром натощак забирали 5 мл крови из вены в пластиковую пробирку, содержащую цитрат. Далее, для получения плазмы крови, обогащенной тромбоцитами (ПОТ), образцы центрифугировали при 200g в течение 10 мин при комнатной температуре. Переносили надосадочную жидкость в другую пробирку и проводили подсчет тромбоцитов. Осадок тромбоцитов получали путем добавления 800 мкл физиологического раствора к 200 мкл ПОТ и центрифугирования (4500g, 10 мин). Надосадочную жидкость удаляли. К осадку тромбоцитов добавляли 200 мкл дистиллированной воды и тщательно перемешивали на вортексе. Для реакции ацилирования использовали 25 мкл надосадочной жидкости. До ИФА проводили количественное ацилирование серотонина. Интенсивность цветовой реакции измеряли при длине волны 450 нм, а количество серотонина в исследуемых образцах рассчитывали по калибровочной кривой, построенной на основании известных концентраций в стандартах. Содержание серотонина в тромбоцитах определяли отношением к 10^9 тромбоцитов.

Всех пациентов обследовали в динамике заболевания с использованием следующих методик: визуальной аналоговой шкалы астении (ВАШ-А), анкеты балльной субъективной оценки нарушений сна, госпитальной шкалы (HADS) тревоги и депрессии в общесоматической практике, опросника Спилберга–Ханина для определения уровня реактивной тревоги, опросника самооценки депрессии Бека.

Для статистического анализа использовали программы Statistica 6.0 (StatSoft Inc, США) с применением непараметрических методов. Центральные



Концентрация (медиана) тромбоцитарного серотонина у больных ИКБ в динамике заболевания.

тенденции и дисперсии количественных признаков описывали медианой и интерквартильным размахом (25-й и 75-й процентиля). Выявление статистически значимых различий выборок по количественным показателям в независимых группах проводили с помощью *U*-критерия Манна–Уитни, в зависимых – по критерию Вилкоксона, различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Исследование количественного содержания серотонина тромбоцитов крови у всех больных ИКБ в период разгара заболевания независимо от стадии и клинической формы выявило достоверное снижение данного показателя относительно контрольных значений. Средний уровень ТС составил 123,4 (83,1; 495,8) нг/мл, а в группе контроля – 515,2 (378,2; 806,6) нг/мл ($p = 0,005$) (см. рисунок).

Анализ концентрации ТС, проведенный в разгар заболевания у больных с разными стадиями, не установил отличий между их показателями: 121,2 (51,3; 332,1) нг/мл при первой и 174,2 (84,9; 553,1) нг/мл при второй стадии боррелиозов ($p = 0,289$).

В период ранней реконвалесценции уровень ТС в группе больных ИКБ имел тенденцию к повышению – 277,4 (147,8; 511,7) нг/мл ($p = 1,000$), однако оставался значительно ниже, чем в группе контроля ($p = 0,025$). В обе стадии болезни показатели ТС достоверно не изменялись, составляя 171,2 (153,5; 485,0) нг/мл ($p = 0,225$) и 318,7 (147,8; 511,7) нг/мл ($p = 0,052$) соответственно, но были в 2 раза ниже контрольных значений.

Результаты оценки эмоционального статуса, уровня астении и качества сна представлены в таблице. В процессе лечения у всех пациентов с ИКБ отмечено достоверное снижение показателей эмоционально-личностных нарушений. При анализе данных шкалы HADS по параметру «депрессия» установлено, что показатель снизился с 6 (5; 8) баллов в период разгара до 5 (3; 7) баллов в период ранней реконвалесценции ($p = 0,015$), не достигнув уровня лиц контрольной группы 2,5 (1; 4) балла. По параметру «тревога» выявлено снижение данного показателя с 7 (4,5; 8) до 4 (2; 7) ($p = 0,001$), однако его нормализация также не произошло.

Показатели шкалы депрессии Бека в процессе лечения уменьшились с 12,5 (8; 19) до 8 (5; 12) баллов ($p = 0,003$), но отличались от показателей контрольной группы – 2,5 (1; 7) балла ($p = 0,0001$).

Анализ уровня реактивной тревоги по опроснику Спилбергера–Ханина показал, что его изменения в периоды разгара и реконвалесценции не произошло – 46 (44; 47) и 45 (43,5; 47) баллов соответственно ($p = 0,195$), но эти показатели были выше таковых в группе контроля 34,5 (29; 44) балла ($p = 0,001$).

По ВАШ выраженность астении в разгар ИКБ составила 4 (3; 5) балла, а в раннюю реконвалесценцию снизилась до 3 (2; 3) баллов ($p = 0,0001$). В группе контроля ее параметры были значительно ниже – 1 (1; 2) балл ($p = 0,0001$).

По анкетам балльной субъективной оценки нарушений сна в начальном периоде наблюдения у пациентов его величина составила 18 (16; 20), а при повторном тестировании повысилась до уровня здоровых лиц – 19,5 (18; 24) балла ($p = 0,001$).

Изучение корреляционных связей между показателями, полученными при тестировании психоэмоциональных параметров и уровнем ТС, у больных ИКБ в период разгара продемонстрировало отрицательную корреляционную связь между ТС и уровнем реактивной тревоги ($R = -0,81$, $p < 0,05$). В период ранней реконвалесценции определена положительная связь между ТС и показателем балльной оценки сна ($R = 0,84$, $p < 0,05$).

Обсуждение

Результаты исследований отечественных и зарубежных авторов свидетельствуют о том, что содержание серотонина в тромбоцитах периферической

Показатели (в баллах) эмоционального статуса больных ИКБ

| Показатель | Больные ИКБ | | Контрольная группа |
|---|----------------|--------------------------------|--------------------|
| | период разгара | период ранней реконвалесценции | |
| Опросник Бека | 12,5 (8; 19) | 8 (5; 12) | 2,5 (1; 7) |
| Госпитальная шкала: тревога | 7 (4,5; 8) | 4 (2; 7) | 2 (1; 6,5) |
| Госпитальная шкала: депрессия | 6 (5; 8) | 5 (3; 7) | 2,5 (1; 4) |
| Опросник Спилбергера–Ханина: реактивная тревожность | 46 (44; 47) | 45 (43,5; 47) | 34,5 (29; 44) |
| ВАШ астении | 4 (3; 5) | 3 (2; 3) | 1 (1; 2) |
| Сон | 18 (16; 20) | 19,5 (18; 24) | 20 (20; 22) |

крови может рассматриваться в качестве показателя, отражающего его концентрацию в нейронах головного мозга [5, 7, 9].

Анализ уровня ТС крови у больных боррелиозами выявил достоверное снижение данного показателя относительно контрольных значений. Причем при первой и второй стадии инфекции количественные показатели ТС уменьшались одинаково. Уровни тревоги и депрессии у пациентов с ИКБ были значимо выше, чем в группе контроля. Уровень ТС имел отрицательную корреляционную связь с уровнем реактивной тревожности по опроснику Спилберга–Ханина.

Поскольку серотониновая система специализирована существенным образом на обеспечении антидепрессантного эффекта, то тревожно-депрессивный синдром при ИКБ, вероятно, патогенетически обусловлен функциональной недостаточностью серотониновой системы.

Следует отметить, что все пациенты получили курс этиотропного лечения – доксицилин по 0,2 г в сутки в течение 10–14 дней. Такая терапия, безусловно, привела к подавлению кишечной флоры как участника кишечного-мозговой оси, оказывающей влияние не только на функции желудочно-кишечного тракта, но и на ЦНС, способствуя развитию депрессии и когнитивных расстройств [12].

По данным И.О. Железновой и соавт. (2009), признаки органического поражения головного мозга встречаются у всех пациентов с острым течением ИКБ. Наиболее часто (54% случаев) регистрируются обманы восприятия, расстройства памяти, внимания, чувствительности и нарушения настроения. Полагают, что при ИКБ развивается церебральный синдром, который можно расценивать как начальную стадию формирующегося психоорганического синдрома [13].

По данным различных авторов, полное излечение при остром течении ИКБ регистрируется в 65,4–71,1% случаев [1, 13–15]. У части больных, несмотря на проводимую терапию, имеют место различные остаточные изменения в отдаленном периоде: снижение трудоспособности, концентрации внимания и памяти, что значительно влияет на их производственные отношения. При целенаправленном опросе выявляются жалобы на раздражительность, упадок энергии, апатию, повышенную эмоциональную лабильность, колебания настроения, плохой сон. В позднем периоде нередко встречается патология со стороны периферической и ЦНС в виде нестойкой рассеянной неврологической симптоматики по типу рефлекторной (26,3%) и легкой пирамидной недостаточности (9,0%), поражения вегетативной нервной системы (34,6%) [15].

Клинические наблюдения свидетельствуют о том, что у 15–53% больных, перенесших ИКБ, в первые 2–3 мес развиваются проявления резидуального боррелиоза [1] или постлаймовского синдрома [14], которые сохраняются в течение нескольких лет и не ассоциируются с лабораторными и микробиологическими признаками наличия бор-

релиозной инфекции. Данные симптомы значительно снижают качество жизни пациентов, приводят к необходимости проведения длительных реабилитационных мероприятий.

Исходя из результатов нашего исследования, можно предположить, что одним из механизмов развития резидуального синдрома у ряда пациентов после перенесенных боррелиозов является истощение серотониновой системы.

Таким образом, исследование нейротрансмиттера серотонина в остром периоде ИКБ имеет теоретическое и практическое значение, поскольку позволяет оценить возможную степень повреждения нервной ткани при воспалительном процессе, являющегося причиной формирования тревожно-депрессивных проявлений, что требует дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьева Н.Н. Клиника, лечение и профилактика иксодовых клещевых боррелиозов. Пермь: Урал-Пресс; 1998.
2. Воробьева Н.Н., Щекотов В.В., Сумливая О.Н., Неболсина А.П. Клиника иксодовых клещевых боррелиозов на Западном Урале. Пермский медицинский журнал. 2006; 5: 14–22.
3. Иззати-Заде К.Ф., Четвертных В.А., Шутов А.А. Морфометрический анализ гранул серотонина тромбоцитов при мигрени. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2011; 10: 58–61.
4. Каракулова Ю.В., Шутов А.А. Серотонин сыворотки крови при головных болях напряжения. Клиническая медицина. 2005; 6: 55–8.
5. Скворцова В.И., Концевой В.А., Савина М.А., Петрова Е.А., Серпуховитина И.А., Шанина Т.В. Постинсультное генерализованное тревожное расстройство: соотношение с депрессией, факторы риска, влияние на восстановление утраченных функций, патогенез, лечение. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2010; 10: 4–7.
6. Maes M., Meltzer H.Y. The serotonin hypothesis of major depression. In: Psychopharmacol: The Forth Generation of Progress. New York: Raven Press; 1995: 933–44.
7. Jacobs B.L., Azmitia E.C. Structure and function of the brain serotonin system. Physiol. Rev. 1992; 72 (1): 175–216.
8. Sarrías M., Cabre P., Martínez E. Relationship between serotonergic measures in blood and cerebrospinal fluid simultaneously obtained in humans. J. Neurochem. 1990; 54 (3): 783–6.
9. Stahl S.M. Platelets as pharmacological models for the receptors and biochemistry of monoaminergic neurons the platelets. In: Physiology and Pharmacology. Academic Press, INC; 1985: 308–34.
10. Новоселецкая А.И. Характеристика серотонинергической системы у больных экземой. Клиническая дерматология и венерология. 2009; 3: 10–4.
11. Зайко С.Д. Определение биогенных аминов в лабораторной практике. Клинико-лабораторный консилуим. 2009; 4(29): 54–60.
12. Бондаренко В.М., Рябиченко Е.В. Кишечно-мозговая ось. Нейронные и иммунновоспалительные механизмы патологии мозга и кишечника. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2013; 2: 112–20.
13. Железнова И.О., Балашов П.П., Лепехин А.В. Признаки органического поражения головного мозга у пациентов, обследованных в остром периоде иксодового клещевого боррелиоза. Бюллетень сибирской медицины. 2009; 1: 19–24.
14. Лайковская Е.Э., Лесняк О.М., Волкова Л.И. и др. Микстинфекция Лайм-боррелиоза и клещевого энцефалита. В кн.: Проблемы клещевых боррелиозов. М.; 1993: 93–8.

15. Добкина М.Н., Лепехин А.В., Жукова Н.Г., Лукашова Л.В., Завьялова Г.Н., Киюцина Т.А. Катамнез результатов лечения больных с острым иксодовым клещевым боррелиозом. *Бюллетень сибирской медицины*. 2003; 4: 21–30.

REFERENCES

1. Vorob'yeva N.N. The Clinic, Treatment and Prevention of Ixodid Tick-borne Borreliosis. Perm': Ural-Press; 1998. (in Russian)
2. Vorob'yeva N.N., Shchekotov V.V., Sumlivaya O.N., Nebolsina A.P. Clinic of tick-borne borreliosis in western ural. *Permskiy meditsinskiy zhurnal*. 2006; 5: 14–22. (in Russian)
3. Izzati-Zade K.F., Chetvertnykh V.A., Shutov A.A. The morphometric analysis of serotonin granules of platelets in migraine. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2011; 10: 58–61. (in Russian)
4. Karakulova Yu.V., Shutov A.A. Serum serotonin in patients with tension headaches. *Klinicheskaya meditsina*. 2005, 6: 55–8. (in Russian)
5. Skvortsova V.I., Kontsevoy V.A., Savina M.A., Petrova E.A., Serpukhovitina I.A., Shanina T.V. Poststroke generalized anxiety disorder: correlations with depression, risk factors, the influence on the restoration of lost functions, pathogenesis, treatment. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2010; 10: 4–7. (in Russian)
6. Maes M., Meltzer H.Y. The serotonin hypothesis of major depression. In: *Psychopharmacol: The Forth Generation of Progress*. New York: Raven Press; 1995: 933–44.
7. Jacobs B.L., Azmitia E.C. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol. rev.* 1992; 72 (1): 175–216.
8. Sarrias M., Cabre P., Martinez E. Relationship between serotonergic measures in blood and cerebrospinalfluid simultaneously obtained in humans. *J. Neurochem.* 1990; 54 (3): 783–6.
9. Stahl S.M. Platelets as pharmacological models for the receptors and biochemistry of monoaminergic neurons the platelets. In: *Physiology and Pharmacology*. Academic Press, INC; 1985: 308–34.
10. Novoseletskaia A.I. Characteristic of the serotonergic system in patients with eczema. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya*. 2009; 3: 10–4. (in Russian)
11. Zayko S.D. Metanephrines and amines measurement in laboratory practice. *Kliniko-laboratornyy konsilium*. 2009; 4(29): 54–60. (in Russian)
12. Bondarenko V.M., Ryabichenko E.V. Enteric-brain axis. Neural and immunoinflammatory mechanisms of brain pathology and intestines. *Zhurnal microbiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2013; 2: 112–20. (in Russian)
13. Zheleznova I.O., Balashov P.P., Lepekhin A.V. Signs of organic brain damage in patients who were examined in the acute period of Ixodid tick-borne borreliosis. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2009; 1: 19–24. (in Russian)
14. Lesnyak O.M. *Laym-borreliosis*. Ekaterinburg: UGMA; 1999.
15. Dobkina M.N., Lepekhin A.V., Zhukova N.G., Lukashova L.V., Zav'yalova G.N., Kiyutsina T.A. Treatment results catamnesis of patients with acute Ixodid tick-borne borreliosis. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2003; 4: 21–30. (in Russian)