

Ю.С. ВИННИК¹, Д.В. ЧЕРДАНЦЕВ¹, А.Б. САЛМИНА¹,
Н.М. МАРКЕЛОВА¹, С.В. МИЛЛЕР²

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ АПОПТОЗА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ПРИ ОСТРОМ ДЕСТРУКТИВНОМ ПАНКРЕАТИТЕ

ГОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого»

Минздравсоцразвития РФ¹,

МУЗ ГКБ №7 г. Красноярска²,

Российская Федерация

Цель. Изучить роль провоспалительных цитокинов IL-2, IL-6, TNF-а в процессе апоптоза иммунокомпетентных клеток крови и клинически обосновать эффективность ронколейкина для коррекции иммунологических нарушений у больных панкреонекрозом.

Материал и методы. В исследование включены результаты лечения 41 пациента с острым деструктивным панкреатитом. Обследуемые разделены на две группы. В первой группе применялась стандартная схема лечения: инфузионная, спазмолитическая, антисекреторная, антибактериальная терапия. Во второй группе пациентам в комплексную схему лечения был включен препарат ронколейкин – рекомбинантный интерлейкин-2. Исследованы цитокиновый профиль и уровень апоптоза иммунокомпетентных клеток.

Результаты. Установлено, что применение в комплексном лечении препарата ронколейкин патогенетически обосновано. У пациентов исследуемой группы отмечалось снижение повышенных показателей интерлейкина-6 и ФНО-а; а также интенсивности апоптоза иммунокомпетентных клеток, на фоне нормализации уровня интерлейкина-2, что позволило уменьшить число осложнений и летальность.

Заключение. Применение рекомбинантного интерлейкина-2 при лечении пациентов с острым деструктивным панкреатитом является патогенетически обоснованным и эффективным.

Ключевые слова: острый деструктивный панкреатит, цитокины, апоптоз, ронколейкин

Objectives. To investigate the role of the proinflammatory cytokines IL-2, IL-6, TNF-a in the apoptosis process of the immunocompetent blood cells and to ground clinically the efficacy of roncoleukine for the immune disturbances correction in the patients with pancreatonecrosis.

Methods. 41 patients with acute destructive pancreatitis were included into the research. Subjects were divided into two groups. Standard scheme of treatment – infusion, antispasmodic, antisecretory, antibacterial therapy was applied in the first group. The preparation roncoleukine – recombinant interleukin-2 was included in the complex scheme of the patients from the second group. Cytokine profile and the level of apoptosis of immune cells are investigated.

Results. The usage of roncoleukine in the complex treatment is found out to be pathogenetically justified. In the patients of the research group the decrease of the increased parameters of interleukin-6 and TNF-a was marked as well as of apoptosis intensity of the immunocompetent cells on the interleukin-2 level normalization background; it permitted to decrease the number of complications and lethality rate.

Conclusions. Recombinant interleukin-2 usage in treatment of patients with acute destructive pancreatitis is pathogenetically justified and effective.

Keywords: acute destructive pancreatitis, cytokines, apoptosis, roncoleukine

Введение

Острый панкреатит – это одна из «болезней цивилизации». Частота его варьирует от 11 до 23 на 100000 населения в год и неуклонно возрастает в течение нескольких последних десятилетий [1, 2, 3]. Отмечается значительный рост деструктивных форм заболевания, остаются высокими цифры послеоперационной летальности [1, 4, 5].

Данные литературы свидетельствуют о том,

что течение острого панкреатита сопровождается изменениями иммунной реактивности организма. По мнению ряда авторов, выраженность иммунных характеристик синдрома системного воспалительного ответа при панкреонекрозе может индуцировать развитие иммуносупрессии, что приводит к неспособности организма противостоять микробной агрессии и, как следствие, к развитию гнойно-некротических осложнений [2, 6, 7].

Роль медиаторов воспаления в патогенезе

острого повреждения поджелудочной железы изучается с начала 90-х годов. Однако лишь в последние несколько лет стали проявляться сложные взаимодействия цитокинов [8, 9, 10]. Взаимодействуя со специфическими клеточными рецепторами, цитокины могут оказывать стимулирующее или подавляющее влияние на пролиферацию, дифференцировку, миграцию, эффекторную функцию иммунокомпетентных клеток. При этом один и тот же цитокин (TNF- α , IL-2, IL-4 и др.) может оказывать разнонаправленное действие в зависимости от его концентрации, типа специфического рецептора на клетке и ее активационного состояния [5, 6, 11, 12].

Деструкция паренхимы поджелудочной железы и забрюшинной клетчатки у пациентов с тяжелым панкреатитом приводит к генерализации воспалительного процесса во многом благодаря активации пула провоспалительных цитокинов, эффекты которых способствуют развитию панкреатических и системных поражений [13, 14, 15].

Кроме модулирующего влияния на иммунный ответ, провоспалительные цитокины в больших дозах вызывают патологические реакции и способствуют тяжелому течению и генерализации воспалительного процесса при деструктивном панкреатите [3, 16].

Среди многообразия функций цитокинов все возрастающий интерес вызывает их участие в регуляции программированной гибели (апоптоза) клеток иммунной системы [5, 8, 13, 17]. Доказан прямой апоптогенный эффект TNF- α . IL-2 может выступать в качестве как проапоптотического, так и антиапоптотического цитокина в отношении активированных Т-лимфоцитов. Выраженность того или иного эффекта зависит от наличия определенных рецепторов и концентрации этого цитокина [11, 18]. Однако на этот счет нет единого мнения, и вопрос требует более подробного изучения.

Цель исследования: изучить роль провоспалительных цитокинов IL-2, IL-6, TNF- α в процессе апоптоза иммунокомпетентных клеток крови и клинически обосновать эффективность

ронколейкина для коррекции иммунологических нарушений у больных панкреонекрозом.

Материал и методы

Работа носила клинический характер, была выполнена на базе панкреатологического центра в МУЗ ГКБ №7 г. Красноярск.

Представлены результаты исследований, произведенных у 41 пациента с острым деструктивным панкреатитом. Диагноз устанавливался на основании данных анамнеза, объективного обследования, клинико-лабораторных показателей, результатов ультразвукового исследования органов гепатопанкреатодуоденальной зоны, магнитно-резонансной томографии. Всего обследовано 15 мужчин (36,6%) и 26 женщин (63,4%). Возраст пациентов варьировал от 28 до 80 лет.

Причиной развития панкреонекроза в 23 случаях была желчнокаменная болезнь (56,1%), в 11 – злоупотребление алкоголем и его суррогатами (26,8%), и в 7 случаях (17,1%) причину заболевания установить не удалось.

При постановке диагноза пользовались классификацией, принятой на 9 Всероссийском съезде хирургов. Жировой панкреонекроз имел место в 6 случаях (14,6%), геморрагический в 13 (31,7%) и смешанный в 22 (53,6%). Для определения тяжести состояния пациентов и прогноза заболевания использовали шкалу Санкт-Петербургского НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе. У большинства пациентов преобладала средняя степень тяжести состояния – 28 пациентов (68,3%), тяжелая степень зафиксирована у 13 пациентов (31,7%).

Распределение пациентов по группам исследования представлено в таблице 1. Группы были сопоставимы по половому, возрастному показателям, давности начала заболевания, этиологии, клинико-морфологическим формам заболевания и тяжести состояния пациентов.

Всем пациентам проводилось хирургическое лечение. Сроки выполнения операций варьировали от 1 суток до 3 суток от момента поступления в стационар. Показаниями к опера-

Таблица 1

Распределение пациентов по группам исследования

№ группы	Количество пациентов	Диагноз	Метод лечения
1	22	Панкреонекроз	Традиционная терапия
2	19	Панкреонекроз	Традиционная терапия + иммунотерапия ронколейкином

ции были неэффективность консервативной терапии в течение 12–24 часов, появление симптомов перитонита, сочетание панкреатита и деструктивного холецистита, нарастающая механическая желтуха без возможности разрешения с помощью эндоскопических способов декомпрессии желчевыводящих путей.

У 4 пациентов были выполнены видеолапароскопические операции, девять пациентов оперированы из мини-доступа с применением набора инструментов «Мини-ассистент», остальным были произведены традиционные «открытые» операции, включающие верхне-среднесрединную лапаротомию, ревизию органов брюшной полости, широкое рассечение желудочно-ободочной связки, абдоминализацию поджелудочной железы, марсупиализацию сальниковой сумки, санацию и проточное дренирование сальниковой сумки и брюшной полости. По показаниям выполняли люмботомию, дренирование забрюшинного пространства.

В исследуемую группу были включены пациенты, у которых помимо традиционной терапии применялась иммунокоррекция препаратом ронколейкин. Инфузии препарата производили внутривенно капельно (15 капель в минуту) в разовой дозе 500000 Ед на 400 мл физиологического раствора с добавлением 10 мл раствора альбумина. Первое введение осуществляли в первые сутки после оперативного вмешательства, кратность составила 2–4 инфузии с интервалом введения от 1 до 3 суток. Введение ронколейкина дополнялось инфузиями белковых препаратов, свежезамороженной плазмы.

Забор крови для исследований производили до операции, в 1, 2, 3, 5, 7, 9, 14, 18, 28, 38 сутки наблюдения.

Изучали общеклинические показатели, а также показатели, характеризующие клеточный и гуморальный иммунитет.

Определение концентрации ИЛ-2, ИЛ-6, TNF- α производили с помощью набора реактивов фирмы BIOSOURCE (Франция) методом твердофазного иммуноферментного анализа. Исследование апоптоза иммунокомпетентных клеток периферической крови производили по методу TUNEL, использовали набор реактивов Apo Direct Kit (Германия).

Статистическая обработка полученных в исследовании данных проводилась на персональном компьютере в статистическом пакете Statistica v.8.0 (StatSoft, USA).

Проводилось вычисление всех необходи-

мых параметров описательной статистики (средних, ошибок средних, среднеквадратических отклонений, дисперсий, медиан, интерквартильных интервалов и т.д.), а также анализ соответствия вида распределения качественных признаков нормальному закону с применением критерия Шапиро-Уилка.

При сравнении групп по количественному нормально распределенному признаку использовали t-критерий Стьюдента для связанных и несвязанных выборок, в остальных случаях использовали не параметрические методы – критерии Манна-Уитни (Z), Вилкоксона, угловое преобразование Фишера (ϕ^*), χ^2 .

Для анализа взаимосвязи двух признаков проводили в случае нормального распределения качественных признаков корреляционный анализ по Пирсону, во всех остальных случаях использовали критерий χ^2 , или проводили корреляционный анализ по Спирмену.

Данные в тексте представлены в виде $M \pm SD$, средние величины округлены до разрядности на один знак точнее исходных данных. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

В иммунном статусе пациентов, которым проводилась иммунокоррекция ронколейкином, выявлены следующие изменения (таблица 2).

Как и в группе сравнения, в первые сутки после операции у пациентов с панкреонекрозом не выявлено существенных нарушений основных показателей иммунограммы. Были незначительно снижены процентное содержание лимфоцитов ($26,3 \pm 1,4\%$), фракций CD2⁺ ($50,8 \pm 2,8\%$), CD4⁺ ($34,5 \pm 3,1\%$). Регистрировались исходно низкие значения фагоцитарного индекса ($29,5 \pm 5,4\%$). Уровень ЦИК находится в пределах верхней границы нормы ($96,5 \pm 6,8$ у.е.). Нарушений в гуморальном звене не зафиксировано, уровень иммуноглобулинов А и G не выходил за пределы нормальных значений. Уровень Ig M незначительно был несколько выше верхней границы нормы ($1,4 \pm 0,6$ г/л). К 7-м суткам наблюдения после стимуляции ронколейкином достоверно повышалось процентное содержание фракции CD2⁺ ($62,5 \pm 4,7\%$) по сравнению с исходными показателями.

К 14-м суткам обращало внимание достоверное снижение количества лимфоцитов в кро-

Таблица 2

Показатели иммунного статуса у пациентов 2 группы на фоне терапии ронколейкином (M±SD)

Показатели	Нормальные значения	Сутки наблюдения		
		1 сутки	7 суток	14 суток
Лимфоциты, %	28-39	26,3±1,4	25,1±2,4	22,3±0,7 ^{1,2}
Лимфоциты, абс. кол-во (кл/мкл)	1600-2400	1646,6±14,5	1621,4±8,7	1572,8±11,7 ^{1,2}
Т-лимфоциты, %	67-76	50,8±2,8	62,5±4,7 ¹	69,8±5,6 ¹
Т-хелперы, %	38-46	34,5±3,1	36,8±2,4	45,3±2,4 ¹
Т-супрессоры, %	28-40	28,4±2,4	27,4±2,7	29,8±2,6
ИРИ (Т _х /Т _с)	1,2-2,0	1,21±0,8	1,34±0,9	1,35±0,7
Ig A, г/л	1,4-4,2	2,8±0,4	3,2±1,1	4,6±1,3
Ig G, г/л	8,0-16,6	9,0±1,8	10,4±2,5	12,3±3,7
Ig M, г/л	0,5-1,3	1,4±0,6	1,9±0,4	0,86±0,3
ЦИК, у.е.	0-100	96,5±6,8	72,7±6,3	53,1±4,2 ¹
Фагоцитарный индекс, %	40-80	29,5±5,4	32,4±3,1	16,5±3,1 ^{1,2}
АБОК, %	3-5	7,4±1,2	8,1±1,1	9,3±3,2 ²
Криоглобулины	-	+	+	-

Примечание: 1 – различия достоверны в сравнении с исходными данными (p<0,05); 2 – различия достоверны в сравнении с нормальными значениями (p<0,05)

ви больных ОДП. Процентное содержание лимфоцитов снижалось до 22,3±0,7%, уменьшение абсолютного их количества происходило до 1572,8±11,7 кл/мл. Фагоцитарный индекс также достоверно снижался до 16,5±3,1%.

Показатели провоспалительных цитокинов у пациентов 2 группы на фоне терапии рекомбинантным ИЛ-2 изменялись следующим образом (таблица 3).

При исследовании концентрации эндогенного ИЛ-2 на фоне применения ронколейкина отмечено достоверное возрастание его уровня в сравнении с исходными показателями к 7-м суткам наблюдения до 145,6±9,7 пкг/мл, хотя в первые сутки уровень ИЛ-2, как и в контрольной группе, был значительно ниже нормальных показателей (98,5±6,4 пкг/мл). Однако уже к 9-м суткам вновь происходило снижение его концентрации до исходного уровня (96,8±6,1 пкг/мл), и далее отмечена четкая тенденция к снижению показателя.

Уровень ИЛ-6 у всех пациентов в первые сутки превышал нормальные значения (460,9±11,3

пкг/мл). Однако на фоне стимуляции ронколейкином уже к третьим суткам концентрация его снижалась до 251,8±9,3 пкг/мл, такая тенденция прослеживалась до 7-х суток наблюдения, уровень ИЛ-6 уменьшался до 90,5±6,5 пкг/мл. К 9-м суткам вновь регистрировалось незначительное повышение концентрации ИЛ-6 до 147,2±7,7 пкг/мл, к 14-м суткам уровень ИЛ-6 снова снижался до 74,5±5,2 пкг/мл и оставался на таком уровне до конца периода наблюдения. Как видно, интерлейкины наиболее быстро реагируют изменением уровня на введение рекомбинантного ИЛ-2, так как являются единой регуляторной системой иммунного ответа. Отмечено, что введение рекомбинантного ИЛ-2 пациентам с панкреонекрозом способствует достоверному снижению уровня ИЛ-6, который, как известно, в высоких концентрациях вызывает патологические реакции и является прогностически неблагоприятным признаком течения острого деструктивного панкреатита.

Динамика TNF-α менее выражено изме-

Таблица 3

Динамика уровня провоспалительных цитокинов у пациентов 2 группы (M±SD)

Интерлейкины, пкг/мл	Норма	Сутки наблюдения							
		1	3	5	7	9	14	28	38
ИЛ-2	130,5 ±21,1	98,5 ² ±6,4	129,6 ¹ ±6,4	140,5 ¹ ±8,2	145,6 ±9,7	96,8 ² ±6,1	69,4 ^{1,2} ±4,6	58,1 ^{1,2} ±4,3	20,2 ^{1,2} ±2,2
ИЛ-6	303,1 ±10,4	460,9 ² ±11,3	251,8 ^{1,2} ±9,3	143,4 ^{1,2} ±8,7	90,5 ^{1,2} ±6,5	147,2 ^{1,2} ±7,7	74,5 ^{1,2} ±5,2	81,5 ^{1,2} ±6,4	73,1 ^{1,2} ±4,7
TNF-α	4,27 ±1,23	18,5 ² ±3,4	16,9 ² ±4,1	7,35 ^{1,2} ±2,1	11,2 ^{1,2} ±2,2	13,4 ² ±4,2	10,9 ^{1,2} ±3,1	8,3 ^{1,2} ±2,3	6,0 ¹ ±1,6

Примечание: 1 – достоверность различий в сравнении с исходными данными при p<0,05; 2 – различия достоверны в сравнении с нормальными значениями (p<0,05)

нялась на фоне терапии ронколейкином. Как и в контрольной группе, на протяжении первых трех суток наблюдения регистрировались высокие показатели этого цитокина. К пятым суткам происходило достоверное снижение концентрации в сравнении с исходными цифрами ($p < 0,01$). Далее уровень TNF- α снова повышался, достигая максимума к 9-м суткам ($13,4 \pm 4,2$ пкг/мл). На протяжении дальнейшего периода наблюдения показатели уровня TNF- α имели тенденцию к постепенному снижению, и к 38-м суткам приближались к нормальным цифрам ($6,0 \pm 1,6$ пкг/мл). Таким образом, при исследовании уровня TNF- α у больных ОДП на фоне терапии ронколейкином, несмотря на исходно высокие показатели, отмечено достоверное его снижение с 9-х суток наблюдения в сравнении с контрольной группой.

При исследовании динамики апоптоза иммунокомпетентных клеток отмечено следующее. Исходно показатели достоверно не отличались от показателей в контрольной группе. Далее отмечено увеличение процента апоптоза ИКК, однако пик его приходился не на 5-е, а на 7-е сутки наблюдения в сравнении с контрольной группой, причем процент апоптоза у пациентов 2-й группы был достоверно ниже ($13,2 \pm 0,9\%$), чем у пациентов в контрольной ($19,4 \pm 2,5\%$), ($p < 0,05$). До 9-х суток показатель оставался высоким ($12,3 \pm 1,2\%$), затем уже к 14-м суткам последний снижался в 2 раза ($6,2 \pm 0,4\%$), тенденция к снижению сохранялась до конца периода наблюдения. К 38-м суткам регистрировался минимальный процент апоптоза ИКК ($3,1 \pm 0,2\%$).

Сравнительный анализ частоты осложнений в сравнении с контрольной группой показал, что применение ронколейкина способствовало снижению частоты как ранних, так и поздних осложнений (рис. 1, 2).

Существенно снижалась частота гнойно-септических осложнений у пациентов 2 группы в сравнении с контрольной группой, причем, во второй группе было достоверно меньше распространенных гнойных осложнений (гнойный перитонит, полиорганная недостаточность, распространенная забрюшинная флегмона), преобладали ограниченные формы (абсцесс сальниковой сумки). Летальность во 2 группе составила 15,7% (3 пациента), что на 30,8% ниже, чем в группе пациентов, которым применялась традиционная терапия (22,7%). У всех пациентов причиной летальности стали гнойно-некротические осложнения.

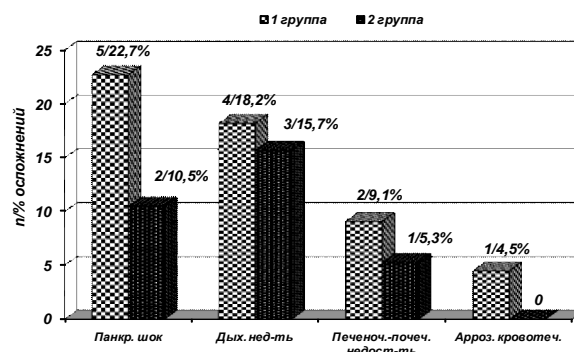


Рис. 1. Частота ранних осложнений у пациентов 1 и 2 групп

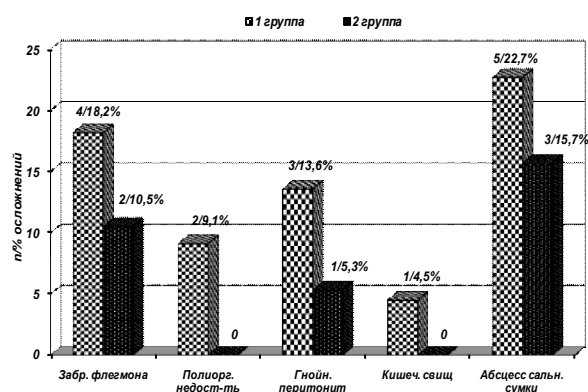


Рис. 2. Частота поздних осложнений у пациентов 1 и 2 групп

Заключение

Таким образом, заместительная терапия ронколейкином на ранних сроках заболевания позволяет регулировать развивающийся медиаторный стресс, что приводит к снижению интенсивности апоптоза иммунокомпетентных клеток у пациентов с острым деструктивным панкреатитом, и предотвращает развитие тяжелого вторичного иммунодефицита. Это благоприятно сказывается на результатах лечения и позволяет уменьшить количество послеоперационных осложнений и летальность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аверкиев, В. Л. Изменения некоторых иммунологических показателей при панкреонекрозе и их коррекция / В. Л. Аверкиев, Л. В. Аверкиева // Хирургия. – 2003. – № 5. – С. 31-34.
2. Бебуришвили, А. Г. Иммунные нарушения и их коррекция при остром панкреатите и гнойном перитоните / А. Г. Бебуришвили, Л. Л. Пугачева, М. П. Козлов // Хирургия. – 1992. – № 7-8. – С. 114-118.
3. Панкреонекроз и панкреатогенный сепсис. Состо-

- яние проблемы / В. С. Савельев [и др.] // *Анналы хирургии*. – 2003. – № 1. – С. 12-19.
4. Диагностика и лечение окислительного стресса при остром панкреатите / Д. В. Черданцев [и др.]. – Красноярск, 2002. – 147 с.
5. Переяслов, А. А. Угнетение действия провоспалительных цитокинов при остром панкреатите: роль миниинвазивных вмешательств / А. А. Переяслов, С.Н. Чуклин // *Анналы хирург. гепатологии*. – 2002. – № 1. – С. 218-219.
6. Бугаев, А. О. Медиаторы воспаления и поражение поджелудочной железы / А. О. Бугаев // *Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. – 1999. – № 4. – С. 15-19.
7. Затевахин, И. И. Оценка объема органных и внеорганных поражений при остром деструктивном панкреатите и ее влияние на летальность // *Анналы хирургии*. – 2002. – № 1. – С. 35-42.
8. Деструктивный панкреатит в свете современных представлений о сепсисе / В. С. Савельев [и др.] // *Анналы хирургии*. – 1999. – № 5. – С. 26-29.
9. Тарасенко, В. С. Характеристика иммунных нарушений у больных острым панкреатитом / В. С. Тарасенко, В. А. Кубышкин, А. И. Смолягин // *Хирургия*. – 2001. – № 4. – С. 31-34.
10. Interleukin-1 receptor antagonist production during infectious and noninfectious systemic inflammatory response syndrome / C. Marie [et al.] // *Crit. Care Med.* – 2000. – Vol. 28, N 7. – P. 2277-2282.
11. Yasuda, H. Cytokine expression and induction of acinar cell apoptosis after pancreatic duct ligation in mice / H. Yasuda, K. Kataoka, H. Ichimura // *J. Interferon Cytokine Res.* – 1999. – Vol. 19. – P. 637-644.
12. Pro versus anti inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options / C. A. Cogos [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2000. – Vol. 181, N 1. – P. 176-180.
13. Белишвина, Н. Н. Молекулярные основы апоптоза / Н. Н. Белишвина, Х. А. Хасан, С. Е. Северин // *Вопр. биол. мед. и фармац. химии*. – 1998. – № 4. – С. 15-23.
14. Хаитов, Р. М. Иммуномодуляторы: механизм действия и клиническое применение / Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин // *Иммунология*. – 2003. – № 4. – С. 196-202.
15. Curley, P. Endotoxin, cellular immune dysfunction and acute pancreatitis / P. Curley // *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* – 1996. – Vol. 78, N 4. – P. 531-535.
16. Konturek, S. J. Nitric oxide in pancreatic secretion and hormone-induced pancreatitis in rats / S. J. Konturek, A. Szlachcic, A. Dembinski // *Int. J. Pancreatol.* – 1994. – Vol. 15. – P. 9-28.
17. Abe, K. Apoptosis of mouse pancreatic acinar cells after duct ligation / K. Abe, S. Watanabe // *Arch. Histol. Cytol.* – 1995. – Vol. 58. – P. 221-229.
18. Lampinen, M. Interleukin-2 inhibits eosinophil migration but it is counteracted by IL-5 priming / M. Lampinen, L. Hakansson, P. Veng // *Clin. Exp. Allergy*. – 2001. – N 3. – P. 249-258.

Адрес для корреспонденции

660022, Российская Федерация,
г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1,
Красноярский государственный медицинский
университет, кафедра общей хирургии,
тел. раб. +7 391 222-97-40,
тел. моб. +7 913 538-38-36,
e-mail: markelova_nadya@mail.ru
Маркелова Н. М.

Поступила 16.02.2011 г.