

© ВОЛКОВИЧ Т.К., 2010

ПРИМЕНЕНИЕ АУТОСЫВОРОТКИ, АКТИВИРОВАННОЙ ЗИМОЗАНОМ, В ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО КЕРАТИТА

ВОЛКОВИЧ Т.К.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»,
кафедра офтальмологии

Резюме. Цель работы – оценить эффективность применения аутосыворотки, активированной зимозаном, в комплексном лечении бактериального кератита в эксперименте.

Экспериментальное исследование выполнено на 102 кроликах. Бактериальный кератит вызывали путем послойной трепанации роговицы и последующим ее инфицированием. Животные были разделены на пять групп: I группа – 1-ые сутки после повреждения и инфицирования роговицы; II группа – без лечения; III группа – антибактериальное лечение; IV группа – лечение аутосывороткой, активированной зимозаном; V группа – комбинированное лечение (антибактериальное и аутосыворотка, активированная зимозаном).

Животным выполняли цитологическое и гистологическое исследования роговицы на 1-е, 3-и, 7-е, 14-е и 30-е сутки наблюдения. Обработку полученных данных проводили в программе «STATISTICA 6.0».

Установлено, что на фоне применения аутосыворотки, активированной зимозаном, отмечалась положительная динамика клинического течения заболевания. Ее использование способствовало очищению язвенно-воспалительной зоны за счет усиления фагоцитоза в результате увеличения числа макрофагов, активации пролиферативных и reparативных процессов.

Применение аутосыворотки, активированной зимозаном, в комплексном лечении бактериального кератита целесообразно с целью снижения воспалительной реакции и активации reparативных процессов в роговице.

Ключевые слова: бактериальный кератит, аутосыворотка, зимозан, эпителизация.

Abstract. The aim of this study was to evaluate the efficacy of zymozan activated autoserum application in complex treatment of bacterial keratitis.

The experimental research was carried out on 102 rabbits. Bacterial keratitis was caused by intralamellar trepanation of the cornea and its subsequent contamination. The animals were divided into five groups: the 1st group – the first day after the damage and contamination of the cornea, the 2nd group – without treatment; the 3rd group – antibacterial treatment; the 4th group – zymozan activated autoserum treatment; the 5th group – the combined treatment (antibacterial treatment and that with zymozan activated autoserum).

Cytologic and histologic researches of the cornea were carried out on the 1st, 3rd, 7th, 14th and 30th days of observation. Statistical processing of the obtained data was performed using the program «STATISTICA 6.0».

It was determined that the application of zymozan activated autoserum resulted in positive dynamics of the clinical course of the disease. Its usage promoted clarification of the ulcerous-inflammatory zone due to phagocytosis enhancement as a result of the increase in the number of macrophages, activation of proliferative and reparative processes.

Zymozan activated autoserum application in complex treatment of bacterial keratitis is expedient for the purpose of decrease of the inflammatory reaction and activation of reparative processes in the cornea.

По-прежнему сохраняет актуальность проблема лечения бактериального кератита. За последние годы было предложено большое количество консервативных и хирургических способов лечения данного заболевания [1, 2, 3, 4, 5]. Тем не менее, частота осложнений и неблагоприятных исходов при бактериальном кератите остается на высоком уровне (9-37,9%). В связи с этим, разработка новых эффективных методов лечения данной патологии имеет большое медицинское, социальное и экономическое значение.

В основе консервативного лечения бактериального кератита лежит применение антибактериальных, противовоспалительных, репаративных и метаболических препаратов [6, 7].

Для защиты регенерирующего эпителия, а, следовательно, улучшения эпителиализации предложено использование мягких контактных линз [8]. Их применение одиночно или в комбинации с трансплантацией фибробластов способствует купированию корнеального синдрома и уменьшению отека роговицы. Однако они оказывают лишь временный терапевтический эффект, так как при их длительном ношении возникает гипоксическая реакция в эпителиоцитах, что, в свою очередь, приводит к гибели клеток [8]. При планировании хирургического лечения использование контактных линз возможно для временной защиты воспалительного очага и поддержания анатомии роговицы (при десцеметоцеле, угрозе или свершившейся перфорации) [8].

В комплексном лечении язвы роговицы с целью купирования деструктивно-воспалительного процесса Ф.А. Мисюн и И.Ю. Поромовой (2004) было предложено интрастромальное введение аутокрови через предварительно выполненный разрез роговицы [9].

С целью ускорения эпителиализации роговицы и снижения воспалительной реакции, наряду с применением антибактериальной и репаративной терапии в комплексном лечении бактериального кератита, применяют аутологичную сыворотку [10-13]. K.Tsubota et al. (1999) показали, что лечение с ее использованием эффективно в 43,8% случаев после применения сыворотки в течение 2-х недель и в

62,5% случаев – в течение 1 месяца [13]. Тем не менее, в 16% случаев наблюдались рецидивы эпителиальных дефектов роговицы даже после 2-х месяцев использования аутологичной сыворотки [12].

Консервативные методы лечения эффективны лишь при условии купирования этиологического фактора повреждения либо используются как подготовительный этап к последующей операции. В остальных случаях при длительном и упорном течении процесса, а также при рецидивирующем характере заболевания прибегают к хирургическому лечению – различным вариантам кератопластики и кератопокрытия [4, 5, 14].

Зимозан – сложный полимер полисахаридной природы, выделенный из оболочки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и применяемый в клинической практике в качестве неспецифического стимулятора резистентности организма. Было установлено, что зимозан запускает альтернативный путь активации системы комплемента [15, 16]. Применение аутологичной сыворотки, активированной зимозаном, способствует усилению фагоцитоза за счет увеличения числа, размеров макрофагов, внутримакрофагальной бактерицидной активности, цитотоксичности макрофагов, а также ингибированию миграции макрофагов, пролиферации, активации N- и T-киллеров, T-хелперов, развитию реакции гиперчувствительности замедленного типа, увеличению числа антителообразующих клеток, стимуляции эндо- или экзогенного колониеобразования в костном мозге или в селезенке, эффекту кооперации T- и B-лимфоцитов [15, 16].

Имеется ряд сообщений об успешном применении аутосыворотки, активированной зимозаном, в лечении острой воспалительной патологии брюшной полости [16]. Данный способ лечения направлен на повышение неспецифической резистентности организма путем восстановления функциональной активности нейтрофилов и макрофагов, которые являются первой линией защиты от инфекции [16].

В доступной литературе данных об использовании аутосыворотки, активированной зимозаном, в офтальмологической практике не обнаружено.

Таким образом, представляется актуальным применение аутосыворотки, активированной зимозаном, в комплексном лечении бактериального кератита с целью снижения воспалительной реакции и активации reparативных процессов в роговице.

Цель работы – оценить морфофункциональные изменения роговицы при применении аутосыворотки, активированной зимозаном, в лечении экспериментального бактериального кератита.

Методы

Для оценки эффективности применения аутосыворотки, активированной зимозаном, при лечении бактериального кератита нами был выполнен эксперимент на 102 кроликах-самцах породы шиншилла (204 глаза) массой 3-3,5 кг.

Животные были разделены на следующие группы: I-ая группа – 1-ые сутки после повреждения и инфицирования роговицы (n=12); II-ая группа – без лечения (n=20); III-ая группа – антибактериальное лечение (n=20); IV-ая группа – лечение аутосывороткой, активированной зимозаном (n=20); V-ая группа – комбинированное лечение (антибактериальное и аутосыворотка, активированная зимозаном) (n=20). Контролем служили показатели 10 здоровых животных.

Для моделирования бактериального кератита использовали лабораторный штамм *Staphylococcus aureus* (№ 6538-р), полученный из института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л.А. Тарасевича (г. Москва, Россия).

Под внутривенным нембуталовым наркозом (30 мг/кг массы тела животного) и местной анестезией (инстилляция в конъюнктивальную полость 2% Sol. Lidocaini) в оптической зоне выполняли послойную трепанацию роговицы трепаном диаметром 5 мм на 1/3 толщины стromы. Далее роговицу инфицировали возбудителем путем инстилляции в конъюнктивальную полость бактериальной супензии лабораторного штамма *Staphylococcus aureus*. Предварительно живую культуру разводили физиологическим раствором до 3 единиц по McFarland, что соответствовало 10^5 - 10^6 Мт/мл. Для заражения поврежденной поверхности роговицы использовали 1 мл культуры.

В III-ей, IV-ой и V-ой группах животных на первые сутки наблюдения после повреждения и инфицирования роговицы начинали лечение бактериального кератита. Так, в III-ей группе кролики получали только местное антибактериальное лечение (инстилляции в конъюнктивальную полость антибактериального препарата Tobrex 2x (Alcon) два раза в день). Животные IV-ой группы получали аутосыворотку, активированную зимозаном, путем субконъюнктивального введения по 0,2 мл через день в количестве 5 инъекций. В V-ой группе проводили комбинированное лечение антибактериальным препаратом Tobrex 2x (Alcon) и аутосывороткой, активированной зимозаном.

За состоянием животных наблюдали ежедневно. Фоторегистрацию данных объективного осмотра выполняли с помощью цифровой фотокамеры Nikon.

Для определения клеточного состава и морфофункционального состояния эпителия роговицы на 1-е, 3-и, 7-е, 14-е и 30-е сутки после повреждения и инфицирования роговицы выполняли импрессионную цитологию. Световую микроскопию и фоторегистрацию клеточных образцов выполняли на микроскопе Leica DM 2500 при увеличении x100, x200, x400, x1000.

Животных выводили из эксперимента путем введения летальной дозы нембутала для забора глазных яблок и последующей оценки вовлечения в воспалительный процесс роговицы, радужки и цилиарного тела. Животных I-ой группы выводили из эксперимента на 1-е сутки после повреждения и инфицирования, животных II-ой, III-ей, IV-ой и V-ой групп – на 3-и, 7-е, 14-е и 30-е сутки. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином и по Ван-Гизону. Микроскопию выполняли при увеличении x100, x200, x400 и x1000. Морфометрию проводили с помощью программного обеспечения Leica Application Suite.

Основными показателями, учитываемыми при клиническом осмотре, цитологичес-

ком и гистологическом исследовании, являлись начало эпителизации, продолжительность эпителизации, нейтрофильная инфильтрация, фибробласты, неоваскуляризация и характер заживления роговицы.

Статистическую обработку данных проводили с помощью электронных пакетов анализа «STATISTICA 6.0» и «Excel». Учитывая нормальное распределение в исследуемых группах, применяли *t*-критерий Стьюдента (уровень достоверности отличий средних значений $p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Проведенные нами исследования показали, что уже через 24 часа после повреждения и инфицирования роговицы развивался бактериальный кератит с вовлечением в воспалительный процесс конъюнктивы, эпителия и стромы роговицы, радужки и цилиарного тела. У всех экспериментальных животных клинические, цитологические и гистологические признаки на 1-е сутки наблюдения были одинаковы. Так, при клиническом осмотре глазная щель была закрыта, наблюдалась гиперемия, отек век, обильное гнойное отделяемое, выраженная смешанная гиперемия, хемоз конъюнктивы (больше в нижнем сегменте), отек роговицы, более выраженный вок-

руг воспалительного очага. В оптической зоне определялся воспалительный очаг с инфильтрированными краями, рыхлым дном, заполненным детритом (рис. 1). У 61 (66,3 %) животного влага передней камеры выглядела мутной, у 18 (19,5 %) – определялся гипопион высотой 1-2 мм. У всех экспериментальных животных были выявлены отек и гиперемия радужки.

Анализ клеточных образцов, полученных методом импрессионной цитологии на 1-е сутки наблюдения, выявил выраженные некротические и некробиотические изменения в роговице. Язвенно-воспалительную зону формировало большое количество детрита, по ее краю определялась выраженная нейтрофильная инфильтрация, преимущественно за счет сегментоядерных нейтрофилов. Среди последних встречались единичные макрофаги. В перифокальной и паралимбальной зонах наблюдались выраженные некротические и некробиотические изменения с явлениями кариорексиса, карио- и цитолизиса. Кроме того, встречались единичные макрофаги. Клеточный состав паралимбальной области отличался наличием единичных или в отдельных участках отсутствием фибробластов и фибробластов.

Изменения в поверхностных слоях роговицы, выявленные при микроскопии гистологических препаратов, соответствовали цитологическим изменениям. В оптической зоне роговицы (зона моделирования бактериального кератита) эпителий отсутствовал, в прилегающей зоне был истончен с дегенеративными изменениями. Помимо этого, гистологическое исследование выявило изменения в основном веществе роговицы (строма): оно выглядело разволокненным за счет отека, определялась умеренно выраженная, преимущественно нейтрофильно-клеточная воспалительная инфильтрация. Ближе к лимбу в основном веществе отмечалась от умеренной до выраженной диффузная полиморфно-клеточная инфильтрация с преобладанием нейтрофилов. Задняя пограничная пластина (десцеметова мембрана) была несколько утолщена на всем протяжении, эпителий частично десквамирован.

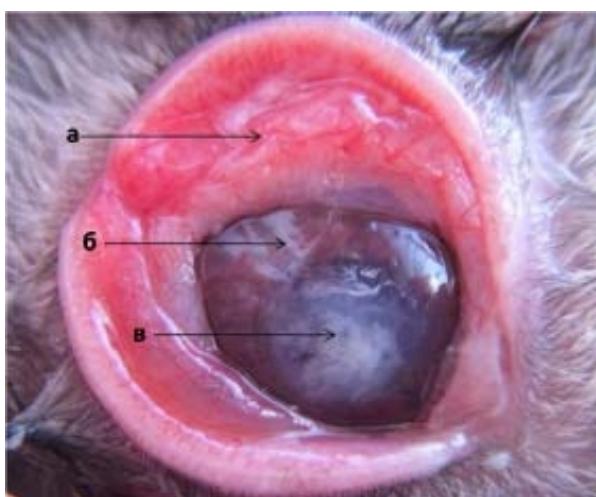


Рис. 1. Бактериальный кератит, 24 часа после повреждения и инфицирования роговицы: а) гиперемия, отек конъюнктивы; б) отек роговицы; в) воспалительный инфильтрат, заполненный детритом.

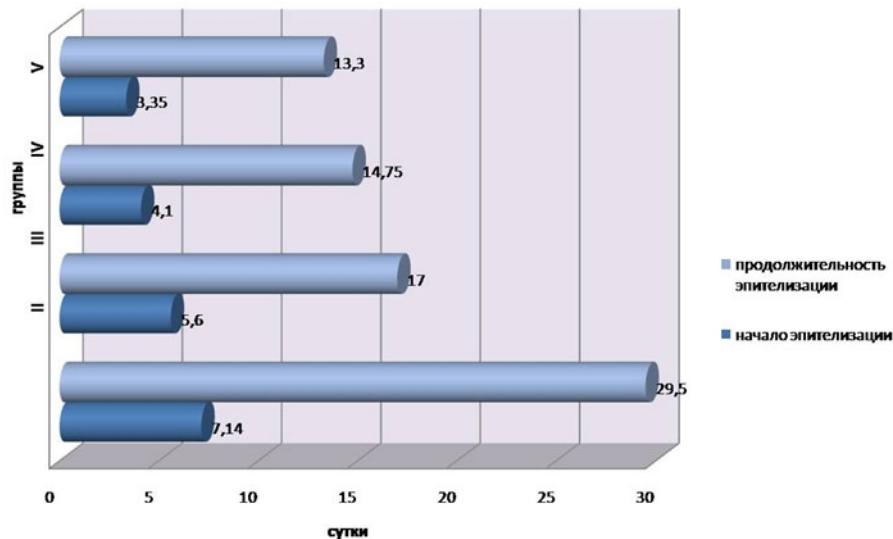


Рис. 2. Сроки начала и продолжительности эпителизации роговицы в исследуемых группах.

Таким образом, изменения, выявленные при клиническом осмотре, цитологическом и гистологическом исследовании, свидетельствовали о тяжести течения бактериального кератита.

В последующие сроки наблюдения (3-и, 7-е, 14-е и 30-е сутки) клиническая, цитологическая и гистологическая картины отличались в исследуемых группах. Так, во II-ой группе к 3-им суткам наблюдалось дальнейшее нарастание воспалительного процесса с нарастанием отека роговицы, конъюнктивы, радужки, а также деструктивных процессов. При световой микроскопии клеточных образцов и гистологических срезов в отличие от 1-ых суток наблюдения были выявлены более выраженные некротические и некробиотические изменения в эпителии роговицы, а также наблюдалось нарастание полиморфно-клеточной воспалительной инфильтрации, в большей степени в паралимбальной зоне.

В IV-ой и V-ой группах на 3-и сутки наблюдалось уменьшение воспалительной реакции со стороны конъюнктивы, роговицы и радужки, очищение язвенного дефекта, также у 18,75% и 65% животных соответственно определялись признаки эпителизации по его краям (рис. 3 б, в). Тогда как в III-ей группе жи-

вотных, получавших только антибактериальное лечение, клиническая картина (рис. 3 а), а также цитологическая и гистологическая, в целом соответствовали 1-ым суткам наблюдения. Так, незначительно уменьшалось количество детрита и нейтрофильной инфильтрации в язвенно-воспалительной зоне. Клинически видимая эпителизация определялась к 5-6 суткам исследования ($5,6 \pm 0,73$, $p < 0,0001$).

Сроки начала и продолжительности эпителизации роговицы в исследуемых группах представлены на рисунке 2.

При микроскопии клеточных образцов животных IV-ой и V-ой групп наблюдалось значительное уменьшение количества тканевого детрита и нейтрофильной инфильтрации, увеличение количества макрофагов в язвенно-воспалительной зоне, фибробластов и фибробластов в перифокальной и паралимбальной зонах. Такая же динамика клеточного состава наблюдалась и при гистологическом исследовании.

Во II-ой группе на 5-е сутки наблюдения при клиническом обследовании была выявлена поверхностная неоваскуляризация 1-2 мм по всей окружности лимба, однако признаков краевой эпителизации язвенно-воспалительного очага выявлено не было.



Рис. 3. Бактериальный кератит, 3-и сутки наблюдения: а) III-я группа – гнойное отделяемое, гиперемия, отек конъюнктины, отек роговицы, язвенно-воспалительный очаг рыхлый, заполнен детритом; б) IV-я группа – гиперемия конъюнктины, небольшой отек роговицы, язвенно-воспалительный очаг очищается от некротических масс, краевая эпителилизация; в) V-я группа – гиперемия конъюнктины, легкий отек роговицы, язвенно-воспалительный очаг эпителизируется.

Последующие сроки наблюдения (7-е, 14-е и 30-е сутки) характеризовались пролиферативными изменениями в роговице во всех исследуемых группах. Так, у экспериментальных животных II-ой группы на 7-е сутки наблюдалось очищение язвенного дефекта от некротических масс, краевая эпителилизация и выраженная поверхностная неоваскуляризация 4-5 мм по всей окружности лимба. При гистологическом исследовании срезов на 7-е, 14-е и 30-е сутки исследования было выявлено, что эпителилизация роговицы сопровождалась формированием акантотических тяжей,

постепенным угасанием нейтрофильной инфильтрации в основном веществе, ростом глубоких новообразованных сосудов по направлению к воспалительному очагу, явлениями склероза и периваскулярного фиброза сосудов радужки и цилиарного тела. Анализ цитологических образцов выявил увеличение количества фибробластов и фибробластов во всех исследуемых зонах по направлению к лимбу. Помимо этого, на 30-е сутки наблюдения в паралимбальной зоне выявлялись меланинодержащие эпителиальные клетки конъюнктивы (рис. 4 а, б), что свидетельствовало о

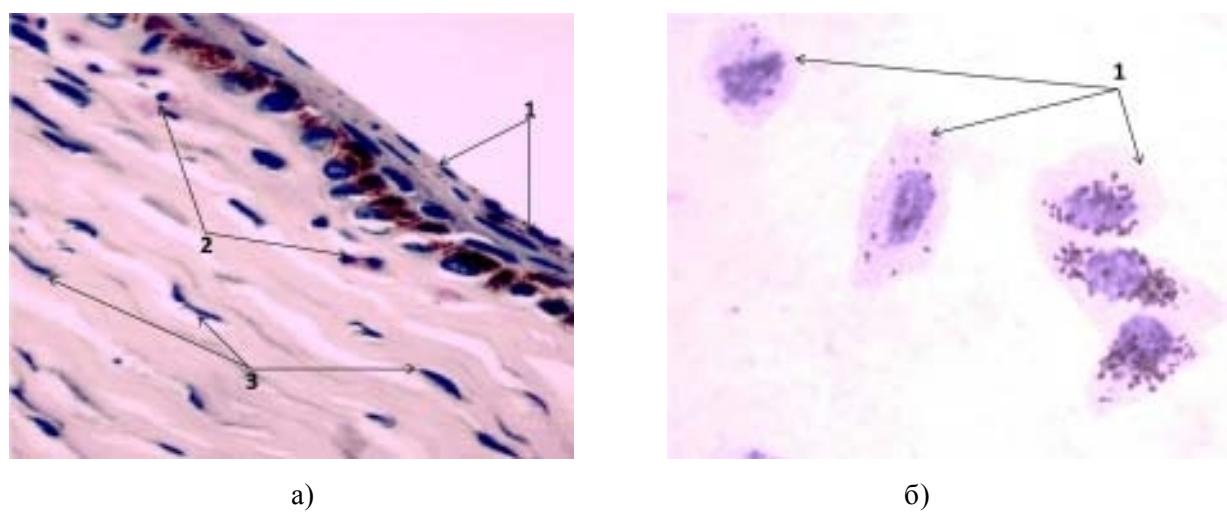


Рис. 4. Бактериальный кератит, 30-е сутки наблюдения, II-я группа: а) гистологический срез роговицы, паралимбальная зона, $\times 1000$; б) импрессионная цитология роговицы, паралимбальная зона, $\times 1000$, где 1 – эпителиальные клетки конъюнктивального эпителия, 2 – нейтрофилы, 3 – фибробласти.

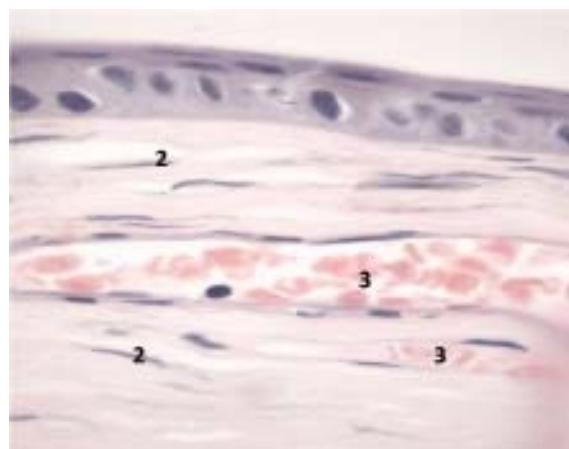
конъюнктивализации роговицы и клинически проявлялось формированием васкуляризованного помутнения (рис. 6 а).

Заживление роговицы экспериментальных животных III-й группы сопровождалось формированием плотного стромального аваскулярного помутнения с полной эпителиализацией роговицы к 16-18 суткам ($17 \pm 0,7$, $p < 0,0001$). Однако при анализе гистологических срезов на 7-е и 14-е сутки были выявлены поверхностно расположенные новообразованные сосуды.

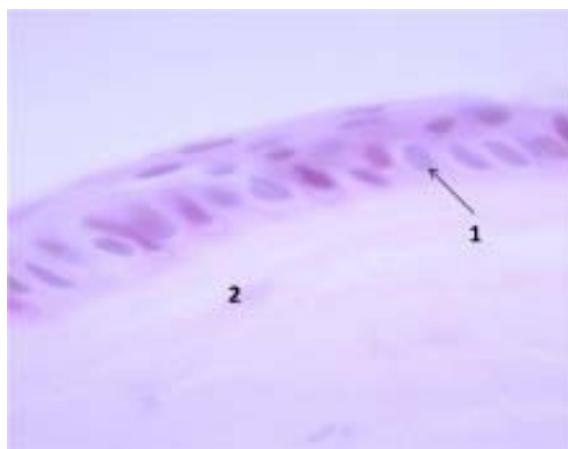
В IV-ой и V-ой группах, по сравнению со II-ой и III-ей, наблюдалось более раннее завершение эпителиализации роговицы к 14-15 ($14,75 \pm 0,46$, $p < 0,0001$) и 13 суткам ($13,3 \pm 0,48$, $p < 0,0001$) соответственно. В отличие от III-й группы помутнение роговицы было менее

плотным (особенно у экспериментальных животных V-ой группы) (рис. 6 б, в, г). Кроме того, при гистологическом исследовании новообразованный эпителиальный пласт выглядел многослойным, с выраженной митотической активностью (рис. 5 б, в), тогда как во II-ой и III-й группах он был истончен по направлению к оптической зоне роговицы с единичными эпителиальными клетками в состоянии митоза (рис. 5 а).

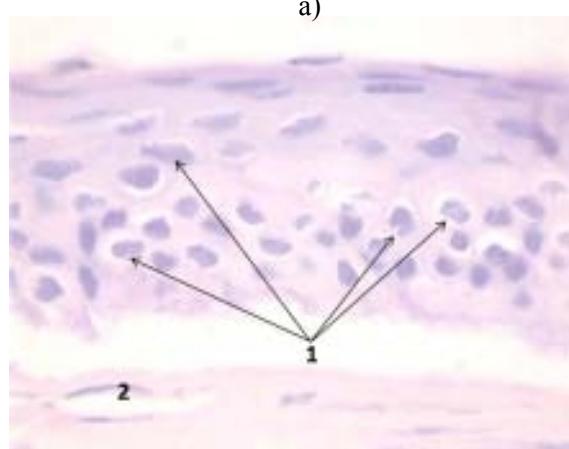
В исходе воспалительного процесса у всех экспериментальных животных формировалось помутнение роговицы, отличающееся в зависимости от проводимого лечения. Так, результатом течения бактериального кератита во II-ой группе стало формирование васкуляризованного помутнения (рис. 6 а). Плотное стромальное помутнение роговицы развилось



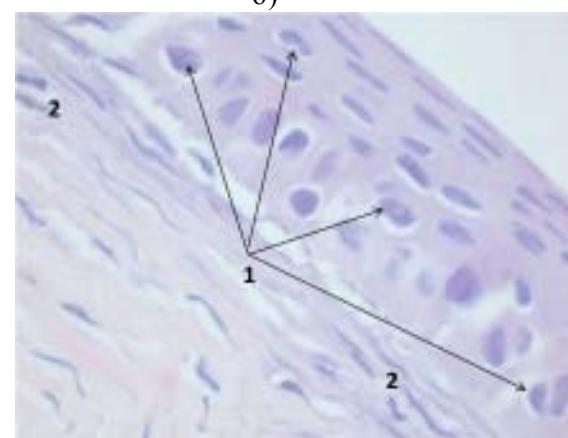
а)



б)



в)



г)

Рис. 5. Толщина эпителиального слоя в паракентральной зоне в исследуемых группах, 30-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином, Ч400: а) II-я группа; б) III-я группа; в) IV-я группа; г) V-я группа, где 1 – митоз эпителиальной клетки, 2 – фибробласты, 3 – просвет сосуда.

у животных, получавших антибактериальное лечение (III-я группа) (рис. 6 б). Тогда как в случаях отдельного применения (IV-я группа) или совместно с антибактериальным препаратом (V-я группа) аутосыворотки, активированной зимозаном, образовывалось облаковидное помутнение, более прозрачное в V-ой группе (рис. 6 в, г).

При проведении эксперимента у трех животных развилось осложнение: во II-ой группе у двух кроликов на 3-и и 5-е сутки сформировался абсцесс роговицы, в III-й группе у одного кролика развился эндофталмит по причине травмы (разрыв склеры), нанесенной самим животным.

Аллергической реакции со стороны конъюнктивы и роговицы на субконъюнктивальное введение аутосыворотки, активированной зимозаном, выявлено не было.

Заключение

1. Применение аутосыворотки, активированной зимозаном, является эффективным средством очищения зоны воспалительного очага роговицы за счет усиления фагоцитоза в результате увеличения числа макрофагов, что сопровождается более ранним купированием воспалительного процесса при экспериментальном бактериальном кератите.

2. Аутосыворотка, активированная зимозаном, способствует активации пролиферативных и reparативных процессов в роговице с сокращением сроков ее эпителизации на 3,7 суток в сравнении с группой животных ($p < 0,0001$), получавших антибактериальное лечение.

3. Данные исследования свидетельствуют о целесообразности практического приме-



а)



б)



в)



г)

Рис. 6. Бактериальный кератит, 30-е сутки наблюдения: а) II-я группа – васкуляризованное помутнение роговицы; б) III-я группа – стромальное помутнение роговицы; в) IV-я группа – облаковидное помутнение роговицы; г) V-я группа – облаковидное помутнение роговицы.

нения аутосыворотки, активированной зимозаном, в комплексном лечении бактериального кератита с целью снижения воспалительной реакции и активации репаративных процессов в роговице.

Литература

1. Этиология и оптимизация лечения гнойных язв роговицы / Н.А. Шульгина [и др.] // Сб. ст. VII Всерос. школы офтальмологов. М., 2008. – С. 410-418.
2. Corticosteroids for bacterial corneal ulcers / M. Srinivasan [et al.] // Br. J. Ophthalmol. – 2009. – Vol. 93. – P. 198-202.
3. Behrens-Baumann, W. Therapy and prognosis of bacterial keratitis / W. Behrens-Baumann, U. Pleyer // Ophthalmologe. – 2007. – Vol. 104(1). – P. 15-20.
4. Clinical profile and surgical complications in the cornea donor study / M.J. Mannis [et al.] // Cornea. – 2006. – Vol. 25, № 2. – P. 164-167.
5. Surgical management of nontraumatic corneal perforations: an 8-year retrospective study / C. Vasseneix [et al.] // Fr. Ophthalmol. – 2006. – Vol. 29, № 7. – P. 751-762.
6. Майчук, Ю.Ф. Левофлоксацин (Таваник) в лечении язвенных поражений роговицы // Антибиотики и химиотерапия. – 2003. – № 48(6). – С. 9-16.
7. Рыбакова, Е.Г. Корнерегель – новый стимулятор репаративной регенерации / Е.Г. Рыбакова // Офтальмология в Беларуси. – 2009. – №3. – С. 63-66.
8. Preliminary study about therapeutical contact lenses use / A. Stanila [et al.] // Oftalmologia. – 2002. – Vol. 52, № 1. – P. 71-74.
9. Мисон, Ф.А. Введение аутокрови при лечении язвы роговицы и ее предперфоративных состояний / Ф.А. Мисон, И.Ю. Поромова // Офтальмохирургия и терапия. – 2004. – Т. 4, № 4. – С. 19-24.
10. Comparison of autologous serum eye drops with conventional therapy in a randomised controlled crossover trial for ocular surface disease / B.A. Noble [et al.] // Br. J. Ophthalmol. – 2004. – Vol. 88. – P. 647-652.
11. Mukerji, N. Role of autologous serum in persistent epithelial defects / N. Mukerji, R. Sinha, R.B. Vajpayee // Br. J. Ophthalmol. – 2002. – Vol. 86. – P. 832.
12. Evaluation of umbilical cord serum therapy for persistent corneal epithelial defects / R.B. Vajpayee [et al.] // Br. J. Ophthalmol. – 2003. – Vol. 87. – P. 1312-1316.
13. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome / K. Tsubota [et al.] // Br. J. Ophthalmol. – 1999. – Vol. 83. – P. 390-395.
14. Effect of Amniotic Membrane Transplantation on the Healing of Bacterial Keratitis / I.S. Barequet [et al.] // Investigative Ophthalmology and Visual Science. – 2008. – Vol. 49. – P. 163-167.
15. Басс-Шадхан, Х.Ф. Зимозан: методы получения. Биохимическая характеристика и перспективы применения / Х.Ф. Басс-Шадхан. – Рига: 1970. – 313 с.
16. Закенфельд, Г.К. Иммунологический механизм действия полисахаридов дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* / Г.К. Закенфельд. – Рига: 1990. – 152 с.

Поступила 09.06.2010 г.

Принята в печать 02.09.2010 г.