

REFERENCES

1. Zarutsky Ya.L., Shudrak A.A. (eds) Instructions from military field surgery. SPD Chalchinska N. V., 2014. 14 p.

2. Zarutsky Ya.L., Zaporozhan V.M., Belyi V.Ya., Denisenko V.M. et al. Military Field Surgery ; ed. Zarutsky Ya.L., Zaporozhan V.M. Odessa, ONMedU, 2016. 416 p.

3. Hayko O.G., Vovchenko G.Ya. Monitoring of structural and functional state of muscles in the trauma of peripheral nerves. Materials of Sciences. Practice conf. from intern Participation

[Treatment of upper limb traumas and their consequences] (Kyiv, May 17-18, 2007). Kyiv, 2007. p. 16-17.

4. Kurinny I.M. Consequences of polystructural trauma of the upper limb and their surgical treatment: author's abstract. MD Thesis. 14.01.21. Kyiv, 2009. 8 p.

5. Kurinny I., Strafun S.S., Kostogrits O.A. Classification of open joint trauma of the upper limb. *Litopys traumatologii ta ortopedii* 2002; 3/4: 45-48.

6. Strafun S.S., Hayko O.G., Kurinny I.M. Clinical-electromyographic and sonographic criteria for determining

the treatment of patients with peripheral nerve damage as a result of trauma of the limbs. *Травма* 2013; 14 (4): 75-80.

7. Ritenour A.E., Blackburne L.H., Kelly J.F. Incidence of primary blast injury in US military overseas contingency operations: a retrospective study. *Ann Surg.* 2010; 251:1140-1144.

Надійшла до редакції 03.10.2017

Рецензент д-р мед. наук,
проф. Ю. В. Сухін,
дата рецензії 09.10.2017

УДК 616.36-002.12.2-06:616.36-018.22:575.174.015.3]-097

К. М. Усиченко, О. М. Усиченко, Ю. І. Бажора

АНАЛІЗ АСОЦІАЦІЇ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ ЦИТОКІНІВ *IL-10*, *IL-4* І *TNF* ІЗ СУБПОПУЛЯЦІЙНИМ СКЛАДОМ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ГЕПАТИТ В ЗАЛЕЖНО ВІД СТУПЕНЯ ФІБРОЗУ ПЕЧІНКИ

Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

УДК 616.36-002.12.2-06:616.36-018.22:575.174.015.3]-097

Е. Н. Усыченко, Е. М. Усыченко, Ю. И. Бажора

АНАЛИЗ АССОЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ *IL-10*, *IL-4* И *TNF* С СУБПОПУЛЯЦИОННЫМ СОСТАВОМ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ В В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ

Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина

Установлен уровень статистической значимости определенных генотипов цитокинов, показателей клеточного иммунитета и степени фиброза печени у больных хроническим гепатитом В (ХГВ), принадлежащих к этнически однородной группе жителей Одесского региона, в сравнении со здоровыми лицами. У пациентов с гомозиготным генотипом *CC IL-4* и гомозиготным генотипом *GG TNF-α* отмечаются меньшие фибротические изменения в печени, чем у носителей гетерозиготного генотипа *CT* ($p < 0,01$) и генотипа *GA*. У больных ХГВ с большей степенью фиброза чаще встречались генотипы *AA TNF-α* и *CT IL-4*, соответственно можно предположить профиброгенную роль этих комбинаций. У пациентов с меньшими изменениями показателей клеточного иммунитета (снижение содержания *CD3+*, *CD4+*, *CD16+*, *CD19+*) отмечается меньшая степень фиброза печени ($p < 0,01$).

Ключевые слова: хронический гепатит В, полиморфизм генов, фиброз печени, клеточный иммунитет.

UDC 616.36-002.12.2-06:616.36-018.22:575.174.015.3]-097

К. М. Usychenko, O. M. Usychenko, Yu. I. Bazhora

ANALYSIS OF ASSOCIATION OF POLYMORPHISM *IL-10*, *IL-4* AND *TNF* CYTOKINES GENES WITH SUB-POPULATION COMPOSITION OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B DEPENDING ON THE DEGREE OF HEPATIC FIBROSIS

The Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine

Aim. To study gene polymorphisms of *IL-10* (*G1082A*), *IL-4* (*C589T*) and *TNF-α* (*G308A*) and cellular immunity (*CD3+*, *CD4+*, *CD8+*, *CD16+*, *CD19+*) in patients with chronic hepatitis B (CHB) and healthy persons belonging to ethnically homogeneous group of residents of the Odessa region, as well as identifying possible association of certain genotypes and the degree of liver fibrosis.



Materials and methods. The study includes 41 patients with CHB. The control group includes of 30 people who did not have diseases of the hepatobiliary system. Traditional diagnostic methods were used by the provided protocol. Polymorphism amplification was investigated using respective portions of the genome by PCR. The structure of the primers used, are described in the GenBank. Evaluation of morphological changes in the liver (the degree of activity and severity of fibrotic changes) was determined on a scale METAVIR using a non-invasive method Fibrotest.

Results. It is established a certain level of statistical significance of certain genotypes of cytokines, cellular immunity and the degree of liver fibrosis. Patients with homozygous *CC* genotype *IL-4* had low level of fibrotic changes in the liver than in carriers of the heterozygous *CT* genotype ($p < 0.01$).

Patients with homozygous genotype *GG* *TNF- α* had low level of liver fibrosis than in carriers of the heterozygous genotype *GA* ($p < 0.01$). Patients with smaller changes in cellular immunity (reduction of CD3+, CD4+, CD16+, CD19+) had low level of liver fibrosis ($p < 0.01$).

Conclusion. It is established that degree of liver fibrosis and certain genotypes *IL-4* and *TNF- α* allows to use the information as one criterion for the speed of progression of liver fibrotic processes. Pronounced changes in cellular immunity is an additional criterion for the degree of morphological disturbances in liver tissue.

Key words: chronic hepatitis B, gene polymorphism, liver fibrosis, cell-mediated immunity.

Вступ

Відомо, що вірус гепатиту В посідає перше місце у світі серед етіологічних факторів, що викликають гепатоцелюлярну карциному.

Хронічне ушкодження вірусом гепатиту В розглядається як результат порушення балансу між регенерацією гепатоцитів і запаленням [1; 2]. Хронічна HCV-інфекція призводить до прогресуючого запалення печінки, а потім — до фіброзу, цирозу і гепатоцелюлярної карциноми. Однак у хворих на хронічний гепатит В (ХГВ) це можливо до формування цирозу, тобто на стадії хронічного гепатиту [3; 4].

Дослідження, присвячені виявленню генетичних маркерів, пов'язаних з індивідуальною реактивністю організму хазяїна, залишаються актуальними, тому що визначення поліморфних генів-модифікаторів імунної відповіді у певного хворого може мати вирішальне значення не тільки для прогнозу захворювання, а і правильного напрямку лікування [5; 6].

Опубліковані нині результати ґрунтуються на дослідженні одного або кількох поліморфізмів, хоча доцільно проводи-

ти комбінований аналіз низки генів та їхніх поліморфізмів і наслідків захворювання.

Очевидно, наявність поліморфізму одночасно в кількох генах, білкові продукти яких залучені в патогенез хронічних вірусних гепатитів, впливають на перебіг та наслідки хронічних гепатитів типу С і В [7–9].

У дослідженнях багатьох авторів показано, що основна роль у розвитку імунної відповіді при ХГВ належить реакціям адаптивного імунітету. При цьому найбільш важливе значення мають специфічні цитотоксичні лімфоцити (CTL), нездатність яких забезпечити адекватну імунну відповідь призводить до розвитку хронічного запального процесу в печінці з подальшим формуванням цирозу печінки і гепатоцелюлярної карциноми [10–12]. Хронічний інфекційний процес розвивається у кількох компонентах імунної системи. При цьому натуральні кілери (NK-клітини) є найважливішими регуляторами вродженого й адаптивного імунітету [13; 14].

Інтенсивна Т-кілерна відповідь — один з факторів розвитку фіброзу. Показано, що є відповідність між вмістом, функціональним станом NK та

NKT і стадіями фіброзних змін у печінці [9; 14; 15].

З огляду на те, що дослідження з вивчення поліморфізму генів різних цитокінів проведено здебільшого у хворих на ХГС або в групі хворих на хронічні гепатити різної етіології, вважаємо за доцільне проаналізувати поліморфізм генів ключових цитокінів *IL-4*, *IL-10*, *TNF- α* у хворих на ХГВ і їхню можливу асоціацію з імунологічними показниками як прогностичних критеріїв наслідків ХГВ.

Мета дослідження — визначення взаємозв'язку між поліморфізмом генів *IL-4*, *IL-10*, *TNF- α* у хворих на ХГВ та імунологічних показників залежно від ступеня фіброзу печінки.

Матеріали та методи дослідження

Обстежено 41 хворого на ХГВ у віці від 18 до 62 років. Усі учасники дослідження — мешканці Одеського регіону, чоловіків було 29 (71 %), а жінок — 12 (29 %) осіб. Давність захворювання становила не більше 10 років.

Контрольна група складалася з 30 практично здорових осіб, середній вік яких ($32,00 \pm 1,05$) року. Кількість жінок і чоловіків була однаковою (по 15 осіб).



Характеристики досліджених поліморфізмів

Ген	Поліморфізм	Назва праймеру	Нуклеотидна послідовність
<i>TNF-α</i>	G308A	rs1800620	5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGC-3'
<i>IL-10</i>	G1082A	rs1800896	5'-CCTATCCCTACTTCCCCT-3'
<i>IL-4</i>	C589T	rs2243250	5'-TAAACTTGGGAGAACATGGT-3'

Для підтвердження діагнозу ХГВ застосовувалися традиційні біохімічні та серологічні тести. Оцінку морфологічних змін у печінці (ступінь активності та виразність фібротичних змін) визначали за шкалою METAVIR з використанням неінвазивного методу Fibrotest.

Визначення поліморфних варіантів генів *IL-4* (C589T), *IL-10* (G1082A), *TNF- α* (G308A) проводили за допомогою ампліфікації відповідних ділянок геному методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Дослідження проводилися на базі Німецького діагностичного центру ім. Св. Павла, Одеса (табл. 1).

Субпопуляційний склад лімфоцитів (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD19+) визначали імунофлуоресцентним методом з використанням набору моноклональних антитіл на імунофлуоресцентному мікроскопі «Євростар».

Отримані результати досліджень були оброблені статистичними методами. З метою виявлення кореляційних залежностей між окремими показниками застосовано коефіцієнт кореляції Спірмена.

Результати дослідження та їх обговорення

При вивченні поліморфної ділянки *IL-4* (C589T) виявлено переважання гомозиготного генотипу CC (норма) як у групі хворих на гепатит В, так і в контрольній групі, що становило 61 і 88 % відповідно

(рис. 1). У групі хворих на ХГВ відзначалося значне переважання гетерозиготного генотипу CT порівняно з контрольною групою, а гомозиготного генотипу TT (мутація) не було виявлено. Частота алеля С у контрольній групі становила 0,9, а в групі хворих на ХГВ — 0,8. Частота алеля Т дорівнювала 0,1 і 0,2 відповідно.

При дослідженні поліморфізму *IL-10* (1082G/A) у хворих на ХГВ відзначалася значно більша мінливість генотипу, ніж у осіб контрольної групи

(рис. 2). Зокрема, гомозиготний генотип GG (норма) у хворих на ХГВ траплявся значно рідше (32 %), ніж у здорових осіб (48 %). У досліджуваній групі переважав гетерозиготний варіант GA (61 %), а в контрольній групі його зустрічальність була низькою (26 %). Частота мутантного варіанта генотипу AA в контрольній і досліджуваній групах істотно відрізнялася (26 і 8 % відповідно). Частота алеля G у контрольній групі становила 0,53, а в групі хворих на ХГВ — 0,62.

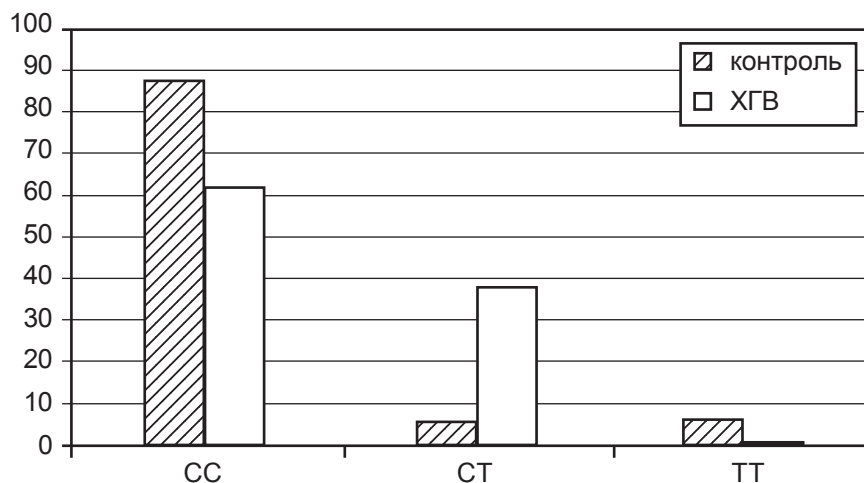


Рис. 1. Розподіл частот генотипів *IL-4* (C589T) у здорових осіб і хворих на хронічний гепатит В

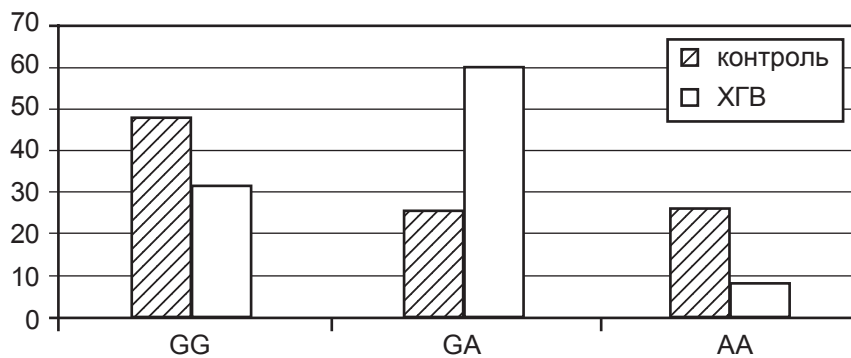


Рис. 2. Розподіл частот генотипів *IL-10* (1082G/A) у здорових осіб і хворих на хронічний гепатит В



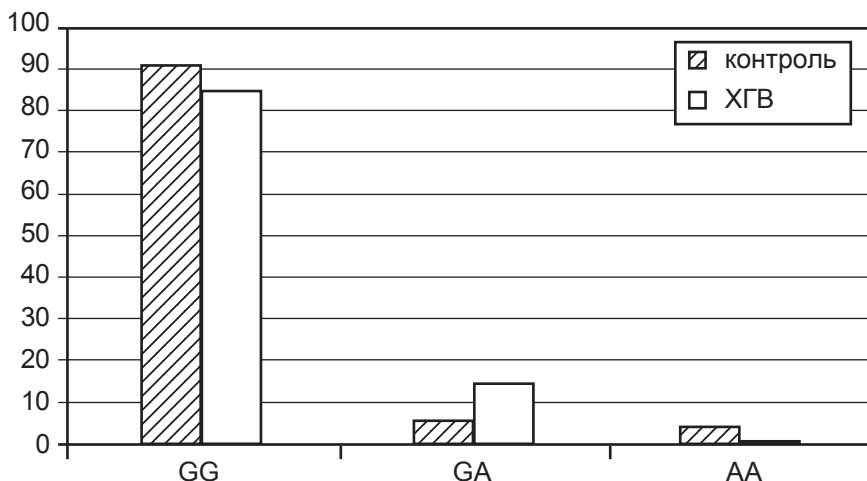


Рис. 3. Розподіл частот генотипів *TNF-α* (*G308A*) у здорових осіб і хворих на хронічний гепатит В

Частота алеля А дорівнювала 0,47 і 0,38 відповідно.

При вивченні поліморфної ділянки *TNF-α* (*G308A*) виявлено переважання гомозиготного генотипу GG (норма) як у групі хворих на гепатит В, так і в контрольній групі, що становило 91 і 85 % відповідно (рис. 3). Однак у групі хворих на ХГВ відзначалося деяке переважання гетерозиготного генотипу GA порівняно з контрольною групою. У досліджуваній групі хворих на хронічний гепатит В гомозиготний генотип TT (мутація) не був виявлений, у контрольній групі такий варіант генотипу виявлено тільки в однієї людини (3 %). Частота алеля G у контрольній групі 0,93, а в групі хворих на ХГВ — 0,89. Частота алеля А дорівнювала 0,07 і 0,11 відповідно.

Результати дослідження низки показників імунологічно-

го статусу у хворих на ХГВ і здорових осіб істотно відрізнялися. У всіх хворих на ХГВ відзначалося зниження відносного вмісту CD3+, CD4+, CD16+, а також збільшення відносної кількості CD8+ і CD19+ (табл. 2).

Для оцінки асоціації ступеня змін печінкової тканини, показників клітинного імунітету й алельного поліморфізму генів усі хворі були розділені на три групи: з відсутнім або мінімальним фіброзом (F0–F1) — 46 %, помірним фіброзом (F2) — 31 % і вираженим фіброзом (F3) — 23 %.

Взаємозв'язок фібротичних змін печінкової тканини, показників клітинного імунітету й алельного поліморфізму досліджуваних генотипів оцінювали за допомогою коефіцієнта рангової кореляції Спірмена.

Таблиця 2

Імунологічні показники у хворих на хронічний гепатит В і здорових осіб, M±m

Показник, %	Хворі на ХГВ, n=41	Здорові особи, n=30
CD3+	41,54±3,55*	71,81±4,50
CD4+	31,66±4,48*	41,22±4,92
CD8+	23,98±3,58*	20,51±4,04
CD16+	12,90±2,90*	14,14±3,48
CD19+	14,93±3,74*	10,83±3,12

Примітка. * — різниця показників достовірна порівняно з показниками здорових людей (p<0,05).

Установлено наявність таких кореляційних зв'язків:

— прямий кореляційний зв'язок між ступенем фіброзу і генотипами *IL-4*, p<0,01 (менший ступінь фіброзу відзначається у носіїв генотипу CC, більший ступінь фіброзу — у носіїв генотипу CT);

— зворотний кореляційний зв'язок між ступенем фіброзу і генотипами *TNF-α*, p<0,01 (менший ступінь фіброзу відзначається у носіїв генотипу GG, більший ступінь фіброзу — у носіїв генотипу AA);

— зворотний кореляційний зв'язок між ступенем фіброзу і відносним вмістом CD3+, CD4+, CD16+, p<0,01 (у пацієнтів з більшим ступенем фіброзу відзначається менший вміст вищезазначених клітин).

У пацієнтів з гомозиготним генотипом CC *IL-4* і гомозиготним генотипом GG *TNF-α* відзначаються менші фібротичні зміни в печінці, ніж у носіїв гетерозиготного генотипу CT (p<0,01) і генотипу GA, таким чином, можна припустити протективну (протизапальну) роль комбінацій CC *IL-4* і GG *TNF-α*.

У хворих на ХГВ з більшим ступенем фіброзу частіше траплялися генотипи AA *TNF-α* і CT *IL-4*, відповідно можна припустити профіброгенну роль цих комбінацій.

У пацієнтів з меншими змінами показників клітинного імунітету (зниження вмісту CD3+, CD4+, CD16+, CD19+) відзначається менший ступінь фіброзу печінки (p<0,01).

Висновки і перспективи подальших досліджень

Наявність взаємозв'язку ступеня фіброзу печінки і певних генотипів *IL-4* і *TNF-α* дозволяє використовувати отриману інформацію як один із критеріїв швидкості прогресування фіброзу печінки. Вираз-



ність змін показників клітинного імунітету є додатковим критерієм ступеня морфологічних порушень у печінковій тканині.

Надалі доцільне вивчення алейного поліморфізму генів інших цитокінів для визначення персоніфікованого підходу в лікуванні та прогнозуванні наслідків хронічних вірусних гепатитів.

Ключові слова: хронічний гепатит В, поліморфізм генів, фіброз печінки, клітинний імунітет.

ЛІТЕРАТУРА

1. Семененко Т. А. Хронический гепатит В и проблема персистенции вируса с позиций иммунопатогенеза заболевания / Т. А. Семененко // Журнал микробиологии. – 2009. – № 4. – С. 33–39.

2. Rehermann B. Immunology of hepatitis B and hepatitis C virus infection / B. Rehermann, M. Nascimbeni // Nat. Rev. Immunol. – 2005. – Vol. 5. – P. 215–229.

3. Возможность обратимости цирроза печени (клинические и патогенетические предпосылки) / Ч. С. Павлов, В. Б. Золотаревский, В. Т. Ивашкин [и др.] // РЖГГК. – 2006. – Т. 16, № 1. – С. 20–29.

4. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level / C. J. Chen, J. Su, C.-L. Jen [et al.] // JAMA. – 2006. – Vol. 295. – P. 65–73.

5. Полиморфизм генов — модификаторов иммунного ответа при заболеваниях печени различной этиологии / И. А. Гончарова, Гамаль Абд Ель Азиз Наср, Е. В. Белобородова [и др.] // Медицинская генетика. – 2010. – № 12. – С. 20–24.

6. Полиморфизм одиночных нуклеотидов в генах цитокінов и их рецепторов: биологический эффект и методы идентификации / Д. Д. Абрамов, И. А. Кофнади, К. В. Уткин [и др.] // Иммунология. – 2011. – № 5. – С. 275–278.

7. Генетические факторы подверженности к хронизации вирусного гепатита и фиброзу печени / И. А. Гончарова, Е. В. Белобородова, М. Б. Фрейдин [и др.] // Молекулярная биология. – 2008. – Т. 42, № 2. – С. 238–241.

8. Rau M. Host Genetic Variants in the Pathogenesis of Hepatitis C / M. Rau, K. Baur, A. Geier // Viruses. – 2012. – Vol. 4. – P. 3281–3302.

9. Анализ влияния генетических факторов вируса гепатита С и поли-

морфизма генов инфицированных людей на развитие фиброза печени / Л. И. Николаева, А. В. Колотвин, Л. М. Самоходская [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2012. – № 5. – С. 7–13.

10. Ивашкин В. Т. Иммунная система и повреждения печени при хронических гепатитах В и С / В. Т. Ивашкин // РЖГГК. – 2009. – № 6. – С. 4–10.

11. Семененко Т. А. Хронический гепатит В и проблема персистенции вируса с позиций иммунопатогенеза заболевания / Т. А. Семененко // Журнал микробиологии. – 2009. – № 4. – С. 33–39.

12. Bim-mediated deletion of antigen – specific CD8 T-cells in patients unable to control HBV infection / A. R. Lopez, P. Kellam, A. Das [et al.] // J. Clin. Invest. – 2008. – Vol. 118. – P. 1835–1845.

13. Natural killers cell functional dichotomy in chronic hepatitis B and chronic hepatitis C virus infection / B. Olivero, S. Varchetta, E. Paudice [et al.] // Gastroenterology. – 2009. – Vol. 137, N 3. – P. 1157–1160.

14. Соотношение субпопуляций ЕК/ЕКТ как прогностический критерий хронического гепатита С / И. П. Балмасова, Н. Д. Ющук, О. О. Знойко [и др.] // Аллергология и иммунология. – 2009. – № 3. – С. 340–343.

15. Особенности цитокинового профиля и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у больных хроническими вирусными гепатитами В и С в сопоставлении с выраженностью морфологических изменений печени / А. С. Лазарева, Е. В. Волчкова, К. Т. Умбетова [и др.] // Терапевтический архив. – 2009. – № 4. – С. 55–60.

REFERENCES

1. Semenenko T.A. Khronicheskiy gepatit B i problema persistentsii virusa s pozitsiy immunopatogeneza zabollevaniya. T.A. Semenenko. Zhurnal mikrobiologii 2009; 4: 33-39.

2. Rehermann B., Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B and hepatitis C virus infection Nat. Rev. Immunol 2005; 5: 215-229.

3. Pavlov Ch.S., Zolotarevskiy V.B., Ivashkin V.T. et al. Vozmozhnost obratimosti tsirroza pecheni (klinicheskie i patogeneticheskie predposylki). RZhGGK 2006; 16; 1: 20-29.

4. Chen C.J., Su J., Jen. C.-L. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level JAMA 2006; 295: 65-73.

5. Goncharova I.A., Gamal Abd El Aziz Nasr, Beloborodova E.V. et al. Polimorfizm genov – modifikatorov im-

munnogo otveta pri zabollevaniyah pecheni razlichnoy etiologii. Meditsinskaya genetika 2010; 12: 20-24.

6. Abramov D.D., Kofnadi I.A., Utkin K.V. et al. Polimorfizm odinochnykh nukleotidov v genah tsitokinov i ih retseptorov: biologicheskiy effekt i metody identifikatsii. Immunologiya 2011; 5: 275-278.

7. Goncharova I.A., Beloborodova E.V., Freydin M.B. et al. Geneticheskie faktoryi podverzhennosti k hronizatsii virusnogo gepatita i fibrozu pecheni. Molekulyarnaya biologiya 2008; 42 (2): 238-241.

8. Monika Rau, Katharina Baur, Andreas Geier Host Genetic Variants in the Pathogenesis of Hepatitis C. Viruses 2012; 4: 3281-3302.

9. Nikolaeva L.I., Kolotvin A.V., Samohodskaya L.M. et al. Analiz vliyaniya geneticheskikh faktorov virusa gepatita C i polimorfizma genov infitsirovannykh lyudey na razvitie fibroza pecheni. Epidemiologiya i infeksionnyye bolezni 2012; 5: 7-13.

10. Ivashkin V.T. Immunnaya sistema i povrezhdeniya pecheni pri hronicheskim gepatitah B i C. RZhGGK 2009; 6: 4-10.

11. Semenenko T.A. Hronicheskiy gepatit B i problema persistentsii virusa s pozitsiy immunopatogeneza zabollevaniya. Zhurnal mikrobiologii 2009; 4: 33-39.

12. Lopez A.R., Kellam P., Das A. Bim-mediated deletion of antigen – specific CD8 T-cells in patients unable to control HBV infection J. Clin. Invest 2008; 118: 1835-1845.

13. Olivero B., Varchetta S., Paudice E. Natural killers cell functional dichotomy in chronic hepatitis B and chronic hepatitis C virus infection. Gastroenterology 2009; 137: 1157-1160.

14. Balmasova I.P., Yuschuk N.D., Znoyko O.O. et al. Sootnoshenie subpopulyatsiy EK/EKT kak prognosticheskiy kriteriy hronicheskiego gepatita C. Allergologiya i immunologiya 2009; 3: 340-343.

15. Lazareva A.S., Volchkova E.V., Umbetova K.T. et al. Osobennosti tsitokinovogo profilya i subpopulyatsionnogo sostava limfotsitov perifericheskoy krovi u bolnykh hronicheskimi virusnyimi gepatitami B i C v sopostavlenii s vyrazhennostyu morfologicheskikh izmeneniy pecheni. Terapevticheskiy arhiv 2009; 4: 55-60.

Надійшла до редакції 10.10.2017

Рецензент д-р мед. наук,
проф. О. Л. Холодкова,
дата рецензії 19.10.2017

