

Л.І. Сімонова, Ю.В. Малюкін,
В.З. Гертман, Л.В. Білогурова,
Ю.Ю. Мікулінський, Я.Е. Вікман,
О.І. Паскевіч

ДУ Інститут медичної
радіології ім. С.П. Григор'єва
АМН України,

Інститут монокристалів НАН
України,

Лабораторія клітинних
біотехнологій ООВ «Вірола»,
Харків

Експериментальна оцінка можливостей ідентифікації стовбурових клітин кісткового мозку з використанням сучасних біосумісних міток

Experimental assessment of the possibility
to identify the bone marrow stem cells using
modern biocompatible tracers

Цель работы: Разработать новые методы мечения стволовых клеток костного мозга (СККМ) с помощью диагностического радионуклида ^{99m}Tc , а также нового люминесцентного красителя H-510/C2 и оценить возможности идентификации трансплантированных меченых СККМ в организме экспериментальных животных.

Материалы и методы: Исследования in vitro проведены на культуре стволовых клеток костного мозга крыс; in vivo — на белых беспородных крысах-самцах весом 180–200 г. В культуре СККМ изучали эффективность связывания радионуклидной метки при использовании трех РФП ^{99m}Tc и при разном уровне активности. Взвесь СККМ, меченных ^{99m}Tc -пирофосфатом натрия, вводили в хвостовую вену интактным крысам в объеме 0,5 мл. Сцинтиграммы животных получали при помощи гамма-камеры через 3, 5 и 24 часа. Для мечения СККМ люминесцентным методом в культуру клеток вводили раствор красителя H-510/C2. 0,5 мл взвеси меченых СККМ вводили внутривенно крысам после операции частичной гепатэктомии. Через 7 и 14 суток с помощью криотома получали нативные гистологические препараты печени и костного мозга. Идентификацию меченых клеток в препаратах проводили на люминесцентном микроскопе "Olympus-IX-71".

Результаты: Предложены новые методы мечения стволовых клеток костного мозга крыс с помощью радионуклида ^{99m}Tc и новой люминесцентной нанометки — красителя H-510/C2. При внутривенном введении СККМ с радиоактивной меткой интактным крысам продемонстрирована возможность их прижизненной идентификации в течение 24 часов для выявления первоначальной направленности миграции донорских клеток в ранние сроки после трансплантации. При внутривенном введении СККМ с люминесцентной меткой крысам после операции частичной гепатэктомии на нативных препаратах печени и костного мозга показана возможность длительного мониторинга динамики и зон расселения донорских клеток в условиях регенерации внутренних органов.

Выводы: Разработаны эффективные методы мечения СККМ крыс с помощью радионуклида ^{99m}Tc и новой люминесцентной нанометки — красителя H-510/C2. Радионуклидный метод мечения СККМ может использоваться для прижизненной идентификации донорских стволовых клеток в ранние сроки после трансплантации. Люминесцентный метод мечения СККМ с помощью нового стабильного красителя может быть использован для длительных наблюдений за расселением трансплантированных стволовых клеток в организме.

Ключевые слова: стволовые клетки, костный мозг, крысы, трансплантация, ^{99m}Tc -пирофосфат, гепатэктомия, печень, люминесценция.

Objective: To work out new methods of labeling bone marrow stem cells (BMSC) using a diagnostic radionuclide Tc-99m as well as a new luminescent stain H-510/C2 and assess the possibility to identify the transplanted labeled BMSC in the organism of experimental animals.

Material and Methods: In vitro investigation was performed on rat BMSC. In vivo investigation was performed on white mongrel male rats weighing 180-200 g. The efficacy of binding the radionuclide tracer when using 3 RP of Tc-99m with various levels of activity (100, 200, 300 MBq/ml) was investigated in BMSC culture (2 mln cells in 1 ml). 0.5 ml of BMSC suspension labeled with 100 MBq of Tc-99m sodium pyrophosphate was injected to the tail vein of intact rats. Scans were obtained using gamma-camera 3, 5, 24 hours after the injection. To label BMSC with luminescent technique the dye solution was introduced to the cell culture (1mln/ml), 0.1 ml per 1 ml of the suspension. 0.5 ml of labeled BMSC suspension was injected after partial hepatectomy. 7 and 14 days after the procedure native histological specimens of the liver and bone marrow were made with cryotome. Identification of the labeled cells was done using luminescent microscopy with Olympus-IX-71.

Results: New methods of labeling BMSC with Tc-99m and new luminescent label (H-510/C2) were suggested. Intravenous administration to intact animals of BMSC with the radionuclide tracer demonstrated the possibility of their vital identification within 24 hours to reveal the initial direction of donor cell migration in early terms after he transplantation. Intravenous injection of BMSC with luminescent label to the rats after partial hepatectomy on the specimens of native liver and bone marrow showed the possibility of long-term monitoring of the dynamics and homing of donor cells in the conditions of inner organs regeneration.

Conclusion: Effective methods of BMSC labeling using Tc-99m and a new luminescent nano-label – H-510/C2 were worked out. Radionuclide BMSC labeling can be used in vital identification of donor stem cells in early terms after transplantation. Luminescent technique of BMSC labeling using a new stable dye can be used for long-term observation of the transplanted stem cell homing in the organism.

Key words: stem cells, bone marrow, rats, transplantation, Tc-99m pyrophosphate, hepatectomy, liver, luminescence.

В останні десятиріччя дуже зросла зацікавленість науковців у використанні стовбурових клітин (СК) у різних медичних галузях. Існує думка, що медицина майбутнього тісно пов'я-

зана зі стовбуровими клітинами. Розвиток клітинної терапії може принципово змінити технології лікування багатьох хвороб, оскільки СК як основний пластичний матеріал уможлиблю-

ють регенерацію будь-яких тканин, відновлення їх функцій. Такі перспективи сформувавши новий напрямок досліджень — «біологія стовбурових клітин». Проте, незважаючи на досягнення й перспективність, у даній галузі існує чимало проблем.

Одним із головних питань клітинної терапії є джерела здобуття СК. Слід зазначити, що досі найбільш вивченими є стовбурові клітини кісткового мозку (СККМ). Хоча у дорослому організмі СК виявлені практично в усіх тканинах, здатних проліферувати, максимально вони сконцентровані в кістковому мозку [1, 2]. Відомо, що СККМ можна одержати не тільки з кісткового мозку, але й з периферичної крові та розплодити їх за допомогою сучасних біотехнологій. Втім упродовж останнього десятиріччя трансплантації СККМ широко використовують при лікуванні різноманітних хвороб, та, на жаль, їх поведінка є непередбачуваною. Важливе, зокрема, питання шляхів розселення (homing) пересаджених СК в організмі і визначення послідовності розповсюдження СК та термінів їх надходження в окремі органи та тканини. Ідентифікація трансплантованих СК в організмі має велике значення, оскільки зазвичай складно стежити за шляхами міграції трансплантованих клітин, які треба помітити, щоб потім візуалізувати. У деяких експериментальних дослідженнях для мічення СК користуються флуоресцентними та люмінесцентними барвниками, які потім фіксують у гістологічних препаратах та виявляють при мікроскопії [3, 4]. Більшість цих світних міток є великодисперсними, вони можуть легко відділятися від мічених клітин у живому організмі, перешкоджаючи правильному трактуванню результатів. Відомо, що були окремі спроби використання для мічення СК радіоактивних ізотопів, наприклад ^3H -тимідину, який потім ідентифікують у препаратах ДНК [5], але цей метод дуже трудомісткий і також не придатний для прижиттєвої ідентифікації. Для мічення СК, які пересаджують людині, досі не створено безпечної мітки, оскільки всі існуючі флуоресцентні барвники мають певну токсичність.

Для вивчення шляхів міграції трансплантованих СК у живому організмі великий інтерес може становити їх прижиттєва ідентифікація.

В доступній літературі ми не знайшли опису методів мічення донорських СК для їх візуалізації в організмі реципієнта. З огляду на викладене вище, актуальною є розробка нових методів мічення СК з використанням як відносно безпечних радіонуклідів (наприклад, використовуваних у радіонуклідній діагностиці), так і нових люмінесцентних барвників.

Метою даної праці було запропонувати нові методи мічення СККМ за допомогою діагностичного радіонукліда $^{99\text{m}}\text{Tc}$ та нового люмінесцентного барвника Н-510/С2 й оцінити можливість ідентифікації трансплантованих мічених СККМ в організмі експериментальних тварин.

Методика дослідження

Метод культивування СККМ щурів. Стовбурові клітини кісткового мозку виділяли шляхом аспірації із стенових кісток безпородних білих щурів. Розчинений і двічі промитий у розчині Хенкса (Sigma, США) кістковий мозок, виділений з кісток тварин, після осадження ресуспензували і клітинну суспензію розсіювали по культуральних середовищах об'ємом 25 мл (Nunc, США) [6]. Культуральне середовище складалося зі стандартного середовища DNEM/F12 (Sigma, США) з додаванням 10 % -вої фетальної бичачої сироватки (ФБС), 2 ммоль L-глутаміну, 1 % -вих NEAA (non-essential amino acids) (всі реактиви фірми Sigma, США) і 50 мкг/мл гентаміцину. Клітини культивували при 37 °С протягом 24 годин, після чого розводили в середовищі Хенкса з розрахунку 1 млн клітин в 1 мл.

Метод мічення СККМ щурів за допомогою радіонукліда $^{99\text{m}}\text{Tc}$. До клітинної суспензії з концентрацією СККМ 1 млн клітин в 1 мл вводили 0,1 мл розчину радіофармпрепарату (РФП) $^{99\text{m}}\text{Tc}$. В процесі розробки методу мічення СККМ проводилися випробування трьох РФП $^{99\text{m}}\text{Tc}$: 1 — чистого елюату $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -пертехнетату натрію; 2 — середньодисперсного колоїду $^{99\text{m}}\text{Tc}$; 3 — $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -пірофосфату. Для вибору необхідної і достатньої для максимального зв'язування дози радіонукліда проводили мічення клітинних проб усіма вищезгаданими РФП з активністю 100, 200 і 300 МБк/мл.

Для встановлення оптимального часового періоду зв'язування радіонукліда стовбуровими клітинами проводили інкубацію при 37 °С протягом 30, 60 і 120 хв. Після інкубації з міткою клітини осаджували центрифугуванням при 1000 об/хв протягом 10 хв, потім тричі промивали середовищем Хенкса для видалення радіоактивної мітки, що не зв'язалася; на кінцевій стадії осад ресуспензували в 1 мл середовища і проводили підрахунок радіоактивності під детектором гамма-камери ГКС-3Н-Т в стандартних геометричних умовах.

Метод мічення СККМ щурів за допомогою люмінесцентної мітки Н-510/С2. Для виготовлення клітинної мітки люмінесцентний барвник Н-510/С2 у вигляді сухого порошку розчиняли в очищеному ДМСО до концентрації 1×10^{-3} моль/л. Потім перед забарвленням вихідний розчин розводили фізіологічним середовищем (розчин Хенкса) до концентрації 1×10^{-5} моль/л. У підготовлену клітинну завись (1 млн клітин в 1 мл) додавали розчин барвника з розрахунку 0,1 мл барвника на 1 мл зависі. Інкубували у термостаті при 37 °С протягом 30 хв.

Підрахунок та ідентифікацію мічених клітин проводили на нативних гістологічних препаратах внутрішніх органів, які готували за допомогою кріотома. Оцінку розповсюдження та стану мітки проводили на 7-му і 14-ту добу. Мікроскопування виконували на люмінесцентному мікроскопі «Olympus-IX-71», який дозволяє виділити довжину хвилі збудження 470 нм. Світіння (люмінесценцію) барвника у клітинах спостерігали в діапазоні довжин хвиль від 500 до 700 нм.

Часткову гепатоектомію у щурів виконували за методом Higgins, Anderson [7]. Тваринам під ефірним наркозом проводили резекцію лівої бічної та лівої внутрішньої часток печінки, що складало 45–50 % печінкової маси.

Введення СККМ здійснювали внутрішньо у хвостову вену щурів.

Експериментальних тварин виводили з експерименту згідно із загальноприйнятими правилами евтаназії [8, 9].

Статистичне опрацювання одержаних результатів проводили на ПК за допомогою пакета програм Statistica.

Результати та їх обговорення

У дослідженні була зроблена спроба створити спосіб мічення СККМ, який був би придатний для прижиттєвої ідентифікації клітин в певних умовах. Для цього експериментально було виконано мічення СК за допомогою нетоксичного короткоживучого радіонукліда ^{99m}Tc , широко застосовуваного в сучасній клінічній радіонуклідній діагностиці.

У завязь СККМ вводили розчини трьох зазначених РФП, що містять ^{99m}Tc , з розрахунку на 1 мл клітинної суспензії з 1 млн клітин — 0,1 мл розчину РФП ^{99m}Tc .

У результаті проведених експериментів було встановлено, що найактивніше СККМ поглинають ^{99m}Tc -пірофосфат натрію, який належить до остеотропних РФП. Ефективність зв'язування мітки для ^{99m}Tc -пірофосфату була в межах 37–38 % при всіх випробуваних дозах активності (100, 200, 300 МБк/мл). Найбільш високий відсоток зв'язування відзначався при інкубації СККМ з міткою протягом 30 хв. Оптимальною величиною дози для мічення проб при заданій концентрації СК була визнана активність 100 МБк. Збільшення дози активності РФП чи часу інкубації не приводило до підвищення відсотка зв'язування клітинами радіоактивної мітки.

Таким чином, було встановлено, що найбільш тропним препаратом до СККМ щурів є ^{99m}Tc -пірофосфат натрію. Достатня доза активності цього РФП для мічення необхідної для трансплантації порції СККМ (1 млн в 1 мл) складає 100 МБк при оптимальному часі

зв'язування 30 хв при 37 °С. В результаті, проведені *in vitro* експерименти з клітинною культурою СККМ щурів дозволили розробити ефективний метод їх мічення за допомогою радіонукліда ^{99m}Tc .

Після отримання культури мічених СККМ була досліджена можливість їх ідентифікації у щурів в експерименті *in vivo*. Використовували 2 групи інтактних тварин — дослідну (10 щурів) і контрольну (5 щурів).

У дослідній групі щурам внутрішньо вводили мічені за вищеописаною методикою СККМ по 0,5 мл у хвостову вену. Зафіксованих тварин поміщали під детектор гамма-камери, одержували зображення на екрані в різних проекціях, потім статичні сцинтиграми комп'ютерно опрацьовувалися та аналізувалися. У передній і задній прямих проекціях оцінювали розподіл мічених СК в організмі щурів.

Контрольним тваринам вводили такий же об'єм фізіологічного розчину ^{99m}Tc -пірофосфату натрію з активністю 100 МБк. Можливості візуалізації мічених клітин в організмі оцінювали в динаміці через 1 годину після введення мічених СККМ, а потім через 3, 5 і 24 години.

Аналіз сцинтиграм контрольних щурів, які одержували тільки РФП, показав, що вже через 1 годину після введення у кістках скелета була помітна інтенсивна фіксація радіонукліда. Головною особливістю фіксації даного РФП у здорових тварин був його рівномірний розподіл в кістках скелета. Такий характер фіксації РФП зберігався впродовж усього періоду спостережень.

На сцинтиграмах щурів з дослідної групи, які одержували мічені СККМ, було зафіксовано інше зображення. Через 1 годину після введення мічених клітин була помітна інтенсивна рівномірна фіксація РФП у ділянці груднини. Слабоінтенсивна фіксація РФП відзначалася також в ділянці середньо-грудного відділу хребта. У решті скелета у тварин дослідної групи РФП не фіксувався, на відміну від тварин контрольної групи. В обох групах тварин через 3 і 5 години після введення РФП зберігалася його інтенсивна фіксація в указаних зонах, проте інтенсивність зображення поступово знижувалась і через 24 години зображення практично не фіксувалося.

Отримані дані свідчать, що мічені ^{99m}Tc -пірофосфатом натрію СККМ вже протягом першої години після введення мігрують у груднину, яка слугує одним з основних депо кровотворних клітин кісткового мозку. В проведених експериментах не було зафіксовано розселення введених мічених СККМ в стегнових кістках, що може бути пов'язано з наявністю великої кількості жирової тканини в кістковомозковому каналі стегнових кісток дорослих щурів [10].

Але найімовірніше, що повне розселення і подальша міграція СККМ в організмі відбувається за триваліший період (більше 24 годин), що не дає можливість зафіксувати за допомогою радіонукліда ^{99m}Tc , який швидко розпадається. Проте, як показують проведені дослідження, за допомогою цього радіонукліда можна визначити первинну спрямованість міграції і розселення трансплантованих СК.

Для довготривалих спостережень за розселенням СККМ в організмі найбільш придатними вважають люмінесцентні методи мічення клітин, хоча, на жаль, візуалізація мічених клітин в органах у цьому випадку можлива тільки у гістологічних препаратах. Але одержані при застосуванні цього методу дані дозволяють визначити знаходження мічених СК у будь-яких органах та тканинах впродовж тривалого часу.

Для візуалізації СК в даній роботі була використана нова наномітка, розроблена в Інституті монокристалів НАН України, — люмінесцентний барвник Н-510/С2. Це органічний люмінесцентний барвник, який належить до класу карбоціанінів. Нова мітка характеризується значною стабільністю, не вимагає вторинного збудження світіння; вона не має токсичності і не впливає ані на донорські клітини, ані на організм реципієнта.

Можливості ідентифікації мічених цим новим барвником СККМ ми досліджували на моделі часткової гепатоектомії у щурів, за допомогою якої можна вивчати homing-ефект на зруйнованих органах та ефективність дії СККМ на активність регенерації.

Піддослідним щурам після операції часткової гепатоектомії внутрішньо вводили 0,5 мл зависі мічених СК. Дослідження проводили на 7-му і 14-ту доби після операції.

У гістологічних зрізах внутрішніх органів (печінка, кістковий мозок) визначали клітинні елементи, які містили мітку.

При мікроскопії у препаратах внутрішніх органів виявлялися як поодинокі флуоресціюючі клітинні елементи, так і їх скупчення, з переважним накопиченням мітки у клітинних мембранах. Так, на 7-му добу у паренхімі регенерувальної ділянки печінки щурів, яким вводили мічені СККМ, можна бачити скупчення світних клітин (заново створені клітини печінкового регенерату), а також світні клітини, розташовані окремо (очевидно, функціонуючі СК) (рис. 1, 2). Люмінесценція клітинних елементів досить яскрава, світіння нерівномірне, але з доволі високою щільністю. Розподіл світних клітин по паренхімі хаотичний. Привертає увагу розташування окремих клітин у вигляді довгих смужок, орієнтованих удовж стінок капілярів (рис. 3). Це, ймовірно, пов'язано зі шляхом надходження мічених СККМ у печінкову тканину із капілярного русла.

На 14-ту добу спостережень на зображеннях препаратів печінки, де було майже завершено формування регенерату, яскраві клітини спостерігалися у значно меншій кількості, ніж у попередній період (рис. 3). На препаратах можна побачити тільки окремі світні клітини, хаотично розташовані у паренхімі.

На зображеннях препаратів кісткового мозку щурів на 7-му добу після часткової гепатоектомії та трансплантації СККМ є поширені скупчення світних клітин, люмінесценція яких яскрава та рівномірна (рис. 4). Через 2 тижні кількість світних елементів у кістковому мозку не тільки не зменшувалась, але їх вміст навіть зростав. У цей період (14-та доба) на зображеннях препаратів кісткового мозку щурів можна побачити поширені скупчення світних клітин із яскравою люмінесценцією (рис. 5).

Аналіз мічених люмінесцентною міткою препаратів печінки та кісткового мозку щурів після часткової гепатоектомії дозволяє виявити як деякі напрямки міграції СККМ в травмованому організмі, так і характер динаміки їх розселення. Знаходження на ранньому етапі регенерації (7-ма доба) значної кількості мічених клітин у травмованій печінці вказує на їх спрямовану міграцію в зону ушкодження, яка, певно, притя-

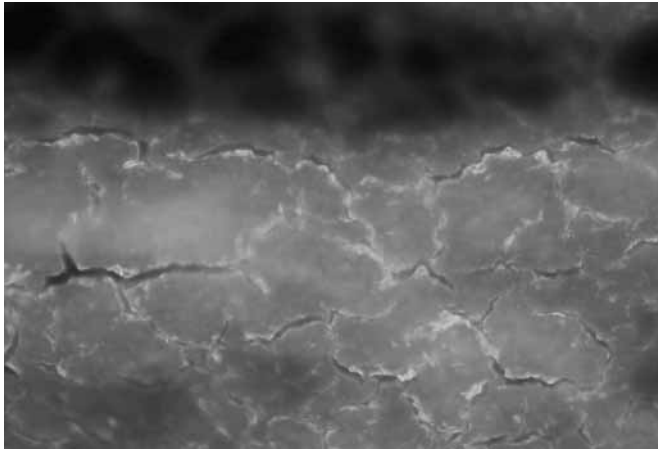


Рис. 1. Зображення регенерувальної ділянки печінки щура на 7-му добу після часткової гепатоектомії та трансплантації мічених СККМ ($\times 400$)

Fig. 1. Regenerating area of the rat liver on day 7 after partial hepatectomy and transplantation of labeled BMSC ($\times 400$)

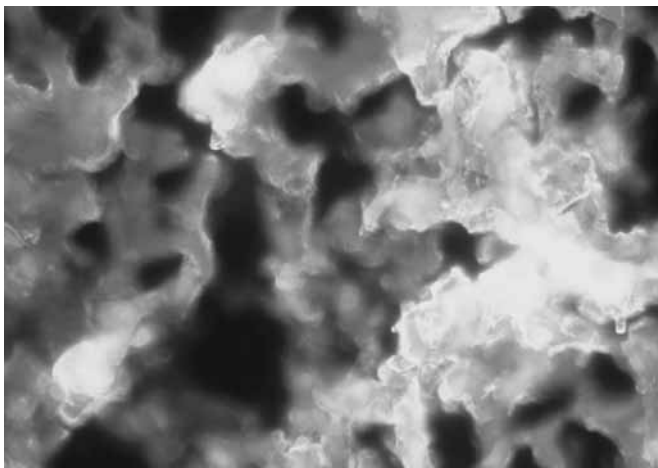


Рис. 2. Світні мічені СККМ у регенераті печінки щура на 7-му добу після часткової гепатоектомії та трансплантації ($\times 600$)

Fig. 2. Luminescence of labeled BMSC in the regenerate of the rat liver on day 7 after partial hepatectomy and transplantation ($\times 600$)

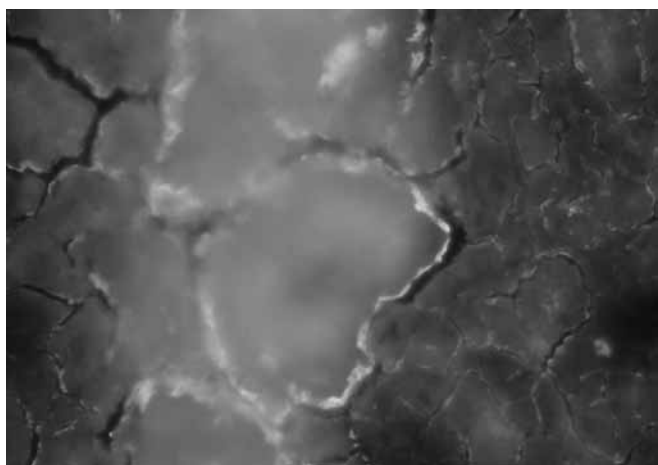


Рис. 3. Світні мічені СК навколо стінок капілярів у регенераті печінки щура на 7-му добу після часткової гепатоектомії та трансплантації ($\times 400$)

Fig. 3. Luminescence of labeled stem cells around the capillaries in the rat liver regenerate on day 7 after partial hepatectomy and transplantation ($\times 400$)

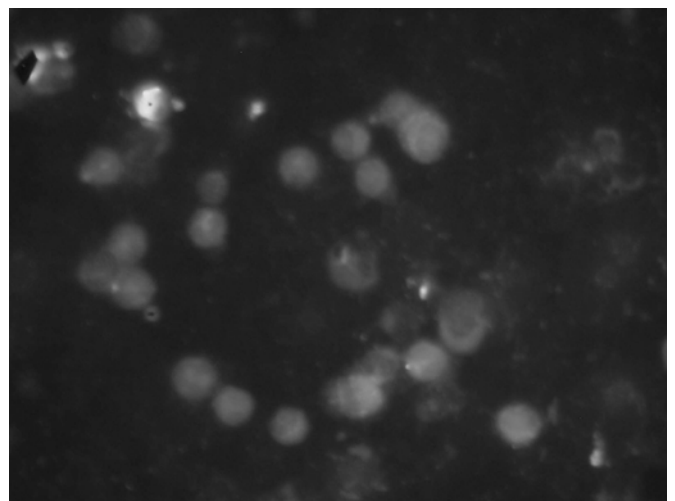


Рис. 4. Світні мічені СККМ на препараті кісткового мозку щура на 7-му добу після часткової гепатоектомії та трансплантації ($\times 600$)

Fig. 4. Luminescence of labeled BMSC on bone marrow specimen on day 7 after partial hepatectomy and transplantation ($\times 600$)

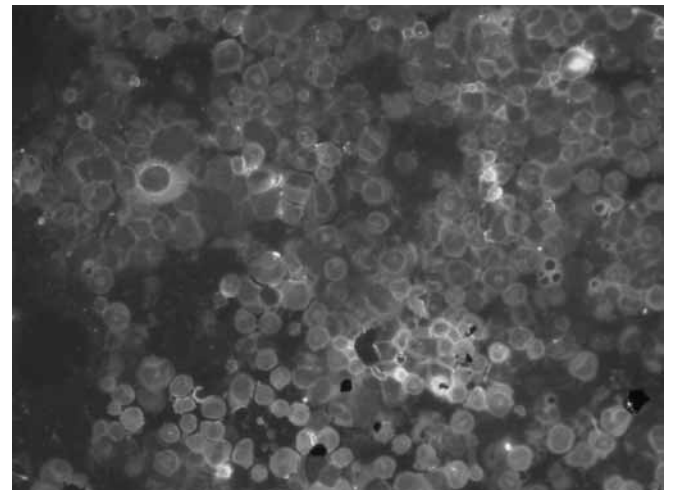


Рис. 5. Світні мічені СККМ на препараті кісткового мозку щура на 14-ту добу після часткової гепатоектомії та трансплантації ($\times 600$)

Fig. 5. Luminescence of labeled BMSC on the bone marrow specimen on day 14 after partial hepatectomy and transplantation ($\times 600$)

гує їх ендогенними індукторами регенерації із загиблих клітин.

Через 14 днів після гепатоектомії та трансплантації більшість збережених СККМ спостерігалася у кістковомозковому просторі. Це узгоджується з даними літератури, які свідчать, що при внутрішньому введенні СККМ вони з часом концентруються тільки у кровотворній тканині [2, 10]. Наші дані показують, що при ушкодженні внутрішніх органів (у даному випадку — печінки), ймовірно, відбувається міграція СК за більш складним маршрутом, а частина

їх потрапляє в зону ушкодження. Але на кінцевому етапі міграції більшість збережених клітин опиняється у кровотворній тканині як у своєму природному середовищі.

Висновки

1. Проведені дослідження демонструють нові можливості ідентифікації стовбурових клітин в організмі експериментальних тварин. Радіонуклідний метод мічення СККМ, а можливо, й інших клітинних трансплантатів, за допомогою ^{99m}Tc -пірофосфату натрію, доцільно використовувати для ідентифікації клітин на ранніх етапах після трансплантації для визначення «початкового» напрямку міграції і розселення клітинного матеріалу в організмі-реципієнті. До безперечних переваг розробленого методу належать можливість прижиттєвого використання радіонукліда і порівняльна простота його візуалізації, але недоліком є неможливість довготривалої ідентифікації мічених клітин через короткий період напіврозпаду цього радіонукліда.

2. Використання нової люмінесцентної наномітки для мічення СККМ дозволяє ефективно відстежувати протягом тривалого часу розселення трансплантованих клітин в організмі. Внаслідок того, що візуалізація люмінесцентної наномітки здійснюється на нативних препаратах, можна припустити, що в клінічних умовах цю мітку можна буде визначати на біопсійному матеріалі та в периферичній крові.

3. Очевидно, для вивчення поведінки трансплантованих СК в організмі-реципієнті потрібна розробка ще багатьох методів їх ідентифікації в різних умовах.

Література

1. Зак К.П., Бутенко А.К. // Журн. АМН України. — 2004. — Т. 10, № 3. — С. 593–609.
2. Чертков И.Л., Дризе Н.И. // Тер. архив. — 2004. — № 7. — С. 5–11.
3. Wickenhauser C., Thiele J., Kummel T., Fischer R. // Pathol. — 1999. — Vol. 16. — P. 1–10.
4. Qiu L., Meagher R., Welhausen S. et al. // J. Hematother. Stem. Cell. Res. — 1999. — Vol. 8, № 6. — P. 609–618.
5. Строна В.И., Демин Ю.А., Шарлай Т.М. // Пробл. криобиол. — 2001. — № 4. — С. 61–64.
6. Щегельская Е.А., Микулинский Ю.Е., Ревущин А.В. и др. // Онтогенез. — 2003. — Т. 34, № 3. — С. 228–235.
7. Higgins G.M., Anderson R.M. // Arch. Path. — 1931. — № 12. — P. 186–188.
8. Європейська конвенція щодо захисту хребетних тварин, які використовуються з експерименталь-

ними та іншими науковими цілями. — Страсбург, 18.03.86.

9. Дягтерева И.И. Механизм действия трансплантации костного мозга облученным животным. — К.: Здоров'я, 1973. — 100 с.

10. Владимирская Е.Б. // Клин. лаб. диагностика. — 2006. — № 4. — С. 26–32.

Надходження до редакції 30.01.2007.

Прийнято 20.03.2007.

Адреса для листування:
Сімонова Лариса Іванівна,
ДУ Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва АМНУ,
вул. Пушкінська, 82, Харків, 61024, Україна