

PRZEMYSŁAW GAJDA-MORSZEWSKI, KLAUDYNA ŚPIEWAK
(UNIwersYTET JagIELLOŃSKI)

MEDYCZNE ZASTOSOWANIA LAKTOFERYNY

STRESZCZENIE

Laktoferyna, białko wydzielnicze występujące w dużym stężeniu w sianie i mleku, w mniejszym w ślinie, łzach, nasieniu, śluzie itd., od lat przyciąga uwagę badaczy ze względu na szerokie spektrum działania. Przypisuje się jej działanie antybakteryjne, przeciwgrzybicze, antywirusowe, immunomodulacyjne, przeciwnowotworowe oraz wiele innych. W poniższym artykule opisano wyniki najnowszych badań dotyczących medycznych zastosowań laktoferyny. Białko to jest niezwykle interesujące ze względu na różnorodność pełnionych funkcji przy jednoczesnym braku toksyczności, czego dowodem jest posiadanie certyfikatu GRAS (Generally Recognized as Safe).

SŁOWA KLUCZOWE

bydlęca laktoferyna (bLf), laktoferyna (Lf), laktoferycyna, bakteria, HIV, fungi, sepsa

INFORMACJE O AUTORACH

Przemysław Gajda-Morszewski
Zakład Chemii Nieorganicznej, Wydział Chemii
Uniwersytet Jagielloński
e-mail: pgmorszewski@gmail.com

Klaudyna Śpiewak
Zakład Chemii Nieorganicznej, Wydział Chemii
Uniwersytet Jagielloński
e-mail: klaudyna.spiewak@gmail.com

WSTĘP

Laktoferyna (Lf) jest białkiem z rodziny transferyn występującym w płynach i wydzielinach śluzowych ssaków: w mleku, ślinie, łzach, nasieniu itd. Lf jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej około 80 kDa, składającą się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego, posiadającego dwa homologiczne płyty: N oraz C (ryc.). Główną funkcją laktoferyny pełnioną w organizmie ludzkim jest wiązanie wolnych jonów żelaza, stąd w jej strukturze znajdują się dwa specyficzne miejsca wiążące o wysokim powinowactwie do jonów Fe^{3+} . Laktoferyna, wiążąc żelazo, zmniejsza jego dostępność dla bakterii patogennych i zapobiega namnażaniu patogenów¹. Oprócz zdolności chelatujących laktoferyna wykazuje istotne działanie immunoregulatorowe, polegające na indukowaniu dojrzewania prekursorowych komórek T do dojrzałych komórek pomocniczych oraz różnicowaniu niedojrzałych komórek B, powodując, że stają się one komórkami efektywnie produkującymi antygeny. Dodatkowo laktoferyna powoduje silne pobudzenie układu odpornościowego².

Szeroko opisywane są właściwości antibakteryjne, przeciwrzybicze i antywirusowe laktoferyny, które przyczyniły się do ogromnego wzrostu zainteresowania tym białkiem jako składnikiem wykorzystywanym do produkcji zarówno suplementów diety, jak i wyrobów medycznych³. Laktoferyna znalazła szczególne zastosowanie w profilaktyce zakażeń u wcześniaków, noworodków i starszych dzieci⁴. Doustna suplementacja różnymi formami laktoferyny ma

¹ S. Farnaud, R. W. Evans, *Lactoferrin – A Multifunctional Protein with Antimicrobial Properties*, “Molecular Immunology” 2003, No. 40, s. 395–405.

² J. K. Actor, S.-A. Hwang, M. L. Kruzel, *Lactoferrin as A Natural Immune Modulator*, “Current Pharmaceutical Design” 2009, No. 15, s. 1956–1973.

³ L. Sanchez, M. Calvo, J. H. Brock, *Biological Role of Lactoferrin*, “Archives of Disease in Childhood” 1992, No. 67, s. 657–661.

⁴ I. M. Akin et al., *Oral Lactoferrin to Prevent Nosocomial Sepsis and Necrotizing Enterocolitis of Premature Neonates and Effect on T-regulatory Cells*, “American Journal of Perinatology” 2014, No. 31, s. 1111–1120; G. Kaur, G. Gathwala, *Efficacy of Bovine Lactoferrin Supplementation in Preventing Late-onset Sepsis in low Birth Weight Neonates: A Randomized Placebo-Controlled Clinical Trial*, “Journal of Tropical Pediatrics” 2015, No. 61, s. 370–376; P. Manzoni et al., *Lactoferrin and Prevention of Late-onset Sepsis in the Pre-term Neonates*, “Early Human Development” 2010, No. 86, Suppl. 1, s. 59–61; P. Manzoni et al., *Bovine Lactoferrin Supplementation for Prevention of Necrotizing Enterocolitis in Very-low-birth-weight Neonates: A Randomized Clinical Trial*, “Early Human Development” 2014, No. 90, s. S60–S65; P. Manzoni et al., *Bovine Lactoferrin Supplementation for Prevention of Late-onset Sepsis in Very Low-birth-weight Neonates: A Randomized Trial*, “JAMA” 2009, No. 302, s. 1421–1428; P. Manzoni et al., *Clinical Use of Lactoferrin in Preterm Neonates: An Update*, “Minerva pediatrica” 2010, No. 62, s. 101–104; P. Mohan, S. A. Abrams, *Oral*

Ryc. Struktura bydłczej laktoferyny z jonami Fe^{3+} w miejscach wiążących.
Rysunek wykonano za pomocą programu Chimera (PDB: 1BLF)



Źródło: opracowanie własne.

duże znaczenie w łagodzeniu objawów klinicznych zjawiska translokacji bakterii ze światła jelita do krwioobiegu, wywołującego sepsę u noworodków o bardzo małej wadze urodzeniowej. Oprócz prewencji sepsy laktoferyna ma obecnie różnorakie zastosowanie medyczne. W pracy opisano kilka najciekawszych aplikacji tego białka.

Lactoferrin for the Treatment of Sepsis and Necrotizing Enterocolitis in Neonates, "Cochrane Database of Systematic Reviews" 2009, doi:10.1002/14651858.CD007138.pub2; T. J. Ochoa et al., *Randomized Controlled Trial of Lactoferrin for Prevention of Sepsis in Peruvian Neonates Less than 2500 g*, "Pediatric Infectious Disease Journal" 2015, No. 34, s. 571–576; M. Pammi, S. A. Abrams, *Oral Lactoferrin for the Treatment of Sepsis and Necrotizing Enterocolitis in Neonates*, "Cochrane Database of Systematic Reviews" 2011.

AKTYWNOŚĆ ANTYBAKTERYJNA

Właściwości antybakteryjne laktoferyny zostały potwierdzone i opisane przez wiele grup badawczych. Ze względu na bardzo wysokie powinowactwo do żelaza białko to ma właściwości bakteriostatyczne. Kontroluje stężenie jonów Fe^{+3} i wychwytuje wolne żelazo potrzebne bakteriom, co utrudnia ich rozwój⁵. Dodatkowo stwierdzono, że obecność laktoferyny zwiększa ruchliwość bakterii, zapobiegając ich adhezji na powierzchni komórek gospodarza. Utrudnia to także tworzenie struktury zwanej biofilmem – złożonej, odpornej kolonii bakterii otoczonej substancjami organicznymi, które uniemożliwiają kontakt leukocytów i leków z komórkami bakterii⁶. Mechanizm antyadhezyjnego działania laktoferyny nie jest znany.

Antybakteryjne działanie laktoferyny zostało udowodnione zarówno dla bakterii gram-dodatnich, jak i gram-ujemnych w badaniach *in vitro* i *in vivo*⁷. Lizozym będący białkiem kationowym o masie około 14 kDa również należy do systemu ochrony przeciwbakteryjnej organizmu. Niszczy błonę bakterii gram-dodatnich poprzez hydrolizę budujących ją peptydoglikanów. Obecność laktoferyny, która wiąże się do negatywnie naładowanych elementów, zmniejszając tym samym ujemny ładunek całej błony, ułatwia kontakt lizozymu z błoną bakterii. Bakterie gram-ujemne posiadają dodatkową zewnętrzną błonę zbudowaną z lipopolisacharydów (LPS). Błona ta chroni bakterię przed bakteriobójczym lizozymem. Badania wykazały, że bydlęca laktoferyna (bLf) przyczynia się do uwalniania LPS z błon bakterii gram-ujemnych, sprawiając, że są one podatne na hydrofobowe antybiotyki lub na sam lizozym⁸.

⁵ J. Małaczewska, Z. Rotkiewicz, *Laktoferyna – białko multipotencjalne*, „Medycyna Weterynaryjna” 2007, nr 63, s. 136–139.

⁶ M. C. Ammons, V. Copié, *Mini-review: Lactoferrin: A Bioinspired, Anti-biofilm Therapeutic*, “Biofouling” 2013, No. 29, s. 443–455; M. Godoy-Gallardo et al., *Covalent Immobilization of hLf1-11 Peptide on a Titanium Surface Reduces Bacterial Adhesion and Biofilm Formation*, „Acta Biomaterialia” 2014, No. 10, s. 3522–3534.

⁷ D. A. Rodríguez-Franco, L. Vázquez-Moreno, G. Ramos-Clamont Montfort, *Antimicrobial Activity of Lactoferrin: Mechanisms and Possible Clinical Applications*, “Revista Latinoamericana de Microbiología” 2005, No. 47, s. 102–111.

⁸ K. Yamauchi, M. Tomita, T. J. Giehl, R. T. Ellison III, *Antibacterial Activity of Lactoferrin and a Pepsin-derived Lactoferrin Peptide Fragment*, “Infection and Immunity” 1993, No. 61, s. 719–728.

HELICOBACTER PYLORI⁹

Szacuje się, że 80% populacji w krajach rozwijających się oraz 20–50% populacji w krajach rozwiniętych jest zakażonych szczepem *Helicobacter Pylori*. Mechanizm i przyczyny rozwijania się zakażenia nie są znane. Mimo że w wielu przypadkach zakażenie nie rozwija się, to obecność bakterii może być powodem przewlekłej choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy oraz zapalenia żołądka typu B, co może w efekcie prowadzić nawet do nowotworu żołądka.

Pacjentom cierpiącym na choroby spowodowane zakażeniem *H. Pylori* zaleca się terapię trzema lekami. Standardowa terapia potrójna zawiera omeprazol, amoksylicynę oraz klarytromycynę. W latach 2008–2011 przeprowadzono ocenę skuteczności terapii potrójnej, porównując efekty stosowania terapii z dodatkiem probiotyku i laktoferyny z terapią bez dodatku laktoferyny. W badaniach wzięło udział 68 pacjentów, których podzielono na dwie grupy: grupę leczoną kombinacją trzech wspomnianych leków (A) oraz grupę leczoną taką samą kombinacją leków, jednak z dodatkiem probiotyku i wołowej laktoferyny. Badania wykazały, że dodatek Lf nie miał wpływu na szybkość eliminacji bakterii, jednakże u pacjentów z grupy B (30/34) stwierdzono skuteczniejsze zmniejszenie populacji *H. Pylori* niż u pacjentów z grupy A (26/34). Dodatkowo stwierdzono, że w grupie B rzadziej występowały efekty uboczne stosowania terapii potrójnej.

AKTYWNOŚĆ ANTYWIRUSOWA

Laktoferyna wykazuje antywirusowe właściwości przeciwko szerokiemu spektrum zarówno RNA, jak i DNA wirusów. Do zainfekowania komórek dochodzi w momencie kontaktu receptora wirusa z receptorem specyficznym komórki gospodarza. W wyniku tego kontaktu wirus może wnikać do wnętrza komórki. Funkcje receptora specyficznego najczęściej pełnią glikozoaminoglikany. Lf poprzez wiązanie się do tych receptorów utrudnia wirusom wnikięcie do wnętrza komórki, czym hamuje postęp zakażenia¹⁰. Ponieważ infekcje wirusowe są o wiele trudniejsze do leczenia niż infekcje bakteryjne, wykorzystanie

⁹ S. Suerbaum, P. Michetti, *Helicobacter Pylori Infection*, “The New England Journal of Medicine” 2002, No. 347, s. 1175–1186; S. Tolone, V. Pellino, G. Vitaliti, A. Lanzafame, C. Tolone, *Evaluation of Helicobacter Pylori Eradication in Pediatric Patients by Triple Therapy Plus Lactoferrin and Probiotics Compared to Triple Therapy Alone*, “Italian Journal of Pediatrics” 2012, No. 38, s. 63.

¹⁰ P. E. Florian, C. Lazar, N. Nichita, A. Roseanu, [w:] *Viral Infections: Causes, Treatment Options and Potential Complications*, Nova Science Publishers, Inc. 2014, s. 205–246.

laktoferyny w terapii kombinowanej jest tematyką bardzo ważną, która zwraca uwagę środowisk naukowych.

WIRUS HIV

Wirus zespołu nabytego braku odporności (HIV) jest wyzwaniem dla medycyny. Do tej pory nie udało się znaleźć skutecznej terapii. Obecnie stosowane leki mogą jedynie zatrzymać rozwój zakażenia, nie dopuszczając do AIDS i zamieniając HIV w chorobę przewlekłą¹¹. Wiele badań potwierdza, że Lf wykazuje silnie działanie przeciw wirusowi, polegające na opóźnieniu jego replikacji i utrudnianiu mu wnikania do komórek gospodarza według wspomnianego wcześniej mechanizmu blokowania receptorów specyficznych¹². Udowodniono, że naturalnym mechanizmem obronnym organizmu podczas zakażenia wirusem HIV jest wzmożone wydzielanie laktoferyny oraz lizozymu w ślinie, co potwierdza funkcję obronną laktoferyny¹³.

ANTYGRZYBICZE WŁAŚCIWOŚCI LAKTOFERYNY

W literaturze opisywane są również właściwości antygrzybicze laktoferyny. Doświadczonym mechanizmem przeciwgrzybiczego działania Lf jest oddziaływanie ze ścianami komórkowymi grzybów i destabilizacja zewnętrznej ściany powodująca wzrost przepuszczalności błony. Dodatkowo naładowany N-końcowy łańcuch białka może oddziaływać z ujemnie naładowaną ścianą komórkową grzybów.

Udowodniono, że połączenie flukonazolu (leku przeciwgrzybiczego) z laktoferyną daje synergiczny efekt wzmacniający działanie hamujące wzrost *Candida spp.* oraz *Candida albicans* (szczep oporny na flukanazol). Aktywność

¹¹ G. V. Zuccotti, F. Salvini, E. Riva, C. Agostoni, *Oral Lactoferrin in HIV-1 Vertically Infected Children: An Observational Follow-up of Plasma Viral Load and Immune Parameters*, "Journal of International Medical Research" 2006, No. 34, s. 88–94; S. A. González-Chávez, S. Arévalo-Gallegos, Q. Rascón-Cruz, *Lactoferrin: Structure, Function and Applications*, "International Journal of Antimicrobial Agents" 2009, No. 33, s. 301.e1–8; G. V. Zuccotti et al., *Modulation of Innate and Adaptive Immunity by Lactoferrin in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-infected, Antiretroviral Therapy-naïve Children*, "International Journal of Antimicrobial Agents" 2007, No. 29, s. 353–355.

¹² B. Berkhout et al., *Characterization of the Anti-HIV Effects of Native Lactoferrin and Other Milk Proteins and Protein-derived Peptides*, "Antiviral Research" 2002, No. 55, s. 341–355.

¹³ D. Greenspan, J. S. Greenspan, *HIV-related Oral Disease*, "Lancet" 1996, No. 348, s. 729–733.

przeciwwgrzybiczą posiadają również peptydy pochodzące od laktoferyny. Peptyd ludzkiej laktoferyny hLf (1–11, peptyd pochodzący z N-końca łańcucha peptydowego Lf) efektywnie hamował rozwój *Candida albicans* w modelu mysim¹⁴. Aktywność wobec *Candida albicans* wykazywała również laktoferycyna B (17–41, peptyd pochodzący z N-końca łańcucha peptydowego Lf). Komórki tego szczepu po inkubacji z laktoferycyną B zawierały ultra-zniszczenia, wskazujące na autolizę¹⁵. Działanie laktoferyny sprawdzono również podczas badań klinicznych, w których uczestniczyły noworodki z bardzo niską masą urodzeniową, szczególnie narażone na różnego rodzaju zakażenia. Badania dowiodły, że suplementacja laktoferyną powodowała zmniejszenie częstości występowania inwazyjnego zakażenia grzybiczego. Nie zaobserwowano żadnych skutków ubocznych ani nietolerancji¹⁶.

Opisane wyniki stanowią jedynie część z obecnie badanych potencjalnych zastosowań laktoferyny. W Japonii preparaty z laktoferyną badane są pod kątem leczenia otyłości, wciąż też prowadzone są badania mające na celu potwierdzenie jej przeciwnowotworowych właściwości. Laktoferyna obecnie znajduje się w wielu preparatach medycznych i suplementach diety o działaniu wspomagającym odporność, w preparatach na ból gardła oraz mających na celu poprawienie stanu skóry. Korzystny wpływ laktoferyny potwierdza również zasadność karmienia noworodków mlekiem matki.

MEDICAL APPLICATIONS OF LACTOFERRIN

Lactoferrin is a secreted protein found in high concentrations in colostrum and milk, less abundant in saliva, tears, semen and mucus etc. etc., has been attracting the attention of researchers because of the broad spectrum of action. Lactoferrin has an antibacterial, antifungal, antiviral, immunomodulatory, antineoplastic activity and many others. The following article describes the results of recent research on medical applications of lactoferrin. This protein is very interesting because of the variety of functions performed in the absence of toxicity, as evidenced by the certificates have GRAS (Generally Recognized as Safe).

¹⁴ A. Lupetti et al., *Human Lactoferrin-derived Peptide's Antifungal Activities Against Disseminated Candida Albicans Infection*, "Journal of Infectious Diseases" 2007, No. 196, s. 1416–1424.

¹⁵ P. Valenti, P. Visca, G. Antonini, N. Orsi, *Interaction between Lactoferrin and Ovotransferrin and Candida Cells*, "FEMS Microbiology Letters" 1986, No. 33, s. 271–275.

¹⁶ P. Manzoni et. al., *Bovine Lactoferrin Prevents Invasive Fungal Infections in Very Low Birth Weight Infants: A Randomized Controlled Trial*, "Pediatrics" 2012, No. 129, s. 1–10.

KEYWORDS

bovine lactoferrin (bLf), lactoferrin (Lf), lactoferricin, bacteria, HIV, fungi, sepsis

BIBLIOGRAFIA

1. Actor J. K., Hwang S.-A., Kruzel M. L., *Lactoferrin as A Natural Immune Modulator*, "Current Pharmaceutical Design" 2009, No. 15, s. 1956–1973.
2. Akin I. M. et al., *Oral Lactoferrin to Prevent Nosocomial Sepsis and Necrotizing Enterocolitis of Premature Neonates and Effect on T-regulatory Cells*, "American Journal of Perinatology" 2014, No. 31, s. 1111–1120.
3. Ammons M. C., Copié V., *Mini-review: Lactoferrin: A Bioinspired, Anti-biofilm Therapeutic*, "Biofouling" 2013, No. 29, s. 443–455.
4. Berkhout B. et al., *Characterization of the Anti-HIV Effects of Native Lactoferrin and Other Milk Proteins and Protein-derived Peptides*, "Antiviral Research" 2002, No. 55, s. 341–355.
5. Farnaud S., Evans R. W., *Lactoferrin – A Multifunctional Protein with Antimicrobial Properties*, "Molecular Immunology" 2003, No. 40, s. 395–405.
6. Florian P. E., Lazar C., Nichita N., Roseanu A., [w:] *Viral Infections: Causes, Treatment Options and Potential Complications*, Nova Science Publishers, Inc. 2014, s. 205–246.
7. Godoy-Gallardo M. et al., *Covalent Immobilization of hLf1-11 Peptide on a Titanium Surface Reduces Bacterial Adhesion and Biofilm Formation*, „Acta Biomaterialia” 2014, No. 10, s. 3522–3534.
8. González-Chávez S. A., Arévalo-Gallegos S., Rascón-Cruz Q., *Lactoferrin: Structure, Function and Applications*, "International Journal of Antimicrobial Agents" 2009, No. 33, s. 301.e1–8.
9. Greenspan D., Greenspan J. S., *HIV-related Oral Disease*, "Lancet" 1996, No. 348, s. 729–733.
10. Kaur G., Gathwala G., *Efficacy of Bovine Lactoferrin Supplementation in Preventing Late-onset Sepsis in low Birth Weight Neonates: A Randomized Placebo-Controlled Clinical Trial*, "Journal of Tropical Pediatrics" 2015, No. 61, s. 370–376.
11. Lupetti A. et al., *Human Lactoferrin-derived Peptide's Antifungal Activities Against Disseminated Candida Albicans Infection*, "Journal of Infectious Diseases" 2007, No. 196, s. 1416–1424.
12. Małaczewska J., Rotkiewicz Z., *Laktoferyna – białko multipotencjalne*, „Medycyna Weterynaryjna” 2007, nr 63, s. 136–139.
13. Manzoni P. et al., *Bovine Lactoferrin Supplementation for Prevention of Necrotizing Enterocolitis in Very-low-birth-weight Neonates: A Randomized Clinical Trial*, "Early Human Development" 2014, No. 90, s. S60–S65.
14. Manzoni P. et al., *Bovine Lactoferrin Supplementation for Prevention of Late-onset Sepsis in Very Low-birth-weight Neonates: A Randomized Trial*, "JAMA" 2009, No. 302, s. 1421–1428.

15. Manzoni P. et al., *Clinical Use of Lactoferrin in Preterm Neonates: An Update*, "Minerva pediatrica" 2010, No. 62, s. 101–104.
16. Manzoni P. et al., *Lactoferrin and Prevention of Late-onset Sepsis in the Pre-term Neonates*, "Early Human Development" 2010, No. 86, Suppl. 1, s. 59–61.
17. Manzoni P. et. al., *Bovine Lactoferrin Prevents Invasive Fungal Infections in Very Low Birth Weight Infants: A Randomized Controlled Trial*, "Pediatrics" 2012, No. 129, s. 1–10.
18. Mohan P., Abrams S. A., *Oral Lactoferrin for the Treatment of Sepsis and Necrotizing Enterocolitis in Neonates*, "Cochrane Database of Systematic Reviews" 2009, doi:10.1002/14651858.CD007138.pub2.
19. Ochoa T. J. et al., *Randomized Controlled Trial of Lactoferrin for Prevention of Sepsis in Peruvian Neonates Less than 2500 g*, "Pediatric Infectious Disease Journal" 2015, No. 34, s. 571–576.
20. Pammi M., Abrams S. A., *Oral Lactoferrin for the Treatment of Sepsis and Necrotizing Enterocolitis in Neonates*, "Cochrane Database of Systematic Reviews" 2011.
21. Rodríguez-Franco D. A., Vázquez-Moreno L., Ramos-Clamont Montfort G., *Antimicrobial Activity of Lactoferrin: Mechanisms and Possible Clinical Applications*, "Revista Latinoamericana de Microbiología" 2005, No. 47, s. 102–111.
22. Sanchez L., Calvo M., Brock J. H., *Biological Role of Lactoferrin*, "Archives of Disease in Childhood" 1992, No. 67, s. 657–661.
23. Suerbaum S., Michetti P., *Helicobacter Pylori Infection*, "The New England Journal of Medicine" 2002, No. 347, s. 1175–1186.
24. Tolone S., Pellino V., Vitaliti G., Lanzafame A., Tolone C., *Evaluation of Helicobacter Pylori Eradication in Pediatric Patients by Triple Therapy Plus Lactoferrin and Probiotics Compared to Triple Therapy Alone*, "Italian Journal of Pediatrics" 2012, No. 38, s. 63.
25. Valenti P., Visca P., Antonini G., Orsi N., *Interaction between Lactoferrin and Ovotransferrin and Candida Cells*, "FEMS Microbiology Letters" 1986, No. 33, s. 271–275.
26. Yamauchi K., Tomita M., Giehl T. J., Ellison III R. T., *Antibacterial Activity of Lactoferrin and a Pepsin-derived Lactoferrin Peptide Fragment*, "Infection and Immunity" 1993, No. 61, s. 719–728.
27. Zuccotti G. V. et al., *Modulation of Innate and Adaptive Immunity by Lactoferrin in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-infected, Antiretroviral Therapy-naïve Children*, "International Journal of Antimicrobial Agents" 2007, No. 29, s. 353–355.
28. Zuccotti G. V., Salvini F., Riva E., Agostoni C., *Oral Lactoferrin in HIV-1 Vertically Infected Children: An Observational Follow-up of Plasma Viral Load and Immune Parameters*, "Journal of International Medical Research" 2006, No. 34, s. 88–94.

