



УКРАЇНА

(19) UA (11) 31588 (13) U  
(51) МПК (2006)  
A61B 10/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту(54) ПРОЦЕС ПРОГНОЗУВАННЯ ТА РАНЬОЇ ДІАГНОСТИКИ ЕКОЛОГІЧНО ДЕТЕРМІНОВАНИХ СТАНІВ  
У ДІТЕЙ, ЩО ПРОЖИВАЮТЬ В РЕГІОНАХ ІЗ РІЗНИМ ХАРАКТЕРОМ ЗАБРУДНЕННЯ ДОВКІЛЛЯ

1

2

(21) u200714766

(22) 26.12.2007

(24) 10.04.2008

(46) 10.04.2008, Бюл. №7, 2008 рік

(72) ГНАТЕЙКО ОЛЕГ ЗІНОВІЙОВИЧ, UA,  
ЛУК'ЯНЕНКО НАТАЛІЯ СЕРПІВНА, UA, ПЕЧЕНИК  
СЕРПІЙ ОЛЕГОВИЧ, UA, КЕЧ НАТАЛІЯ  
РОМАНІВНА, UA, ЛУЧИНСЬКИЙ МИХАЙЛО  
АНТОНОВИЧ, UA, ЛАБІЙ ЮРІЙ АНАТОЛІЙОВИЧ,  
(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ  
СПАДКОВОЇ ПАТОЛОГІЇ" АМН УКРАЇНИ, UA(57) Процес прогнозування та ранньої діагностики  
екологічно детермінованих станів у дітей, який

включає розрахунок генетичної схильності до розвитку захворювання за адаптованими моделями D. Falkoner та E. Edward, виявлення клінічних ознак хронічної неспецифічної інтоксикації, гіоплазії емалі зубів, гіперплазії щитоподібної залози, нефропатії, який відрізняється тим, що дітям із груп ризику здійснюють низку лабораторних тестів - реакцію специфічного лейкоцитолізу до солей важких металів, виділення продуктів перекисного окислення ліпідів та полярних ліпідів із сечею та тести уринолізису.

Корисна модель відноситься до галузі медицини, зокрема педіатрії, і може бути використаним для ранньої діагностики та прогнозування екологічно детермінованих захворювань дітей.

Відомі способи визначення підвищеної схильності до виникнення екологічно детермінованих станів у дітей базуються на виконанні комплексу молекулярно-генетичних та імунологічних досліджень [1-7]. Серед молекулярних маркерів в першу чергу слід назвати аналіз розподілу алелей генів, що кодують ферменти, відповідальні за детоксикацію ксенобіотиків в організмі. Наявність в генотипі певних алелей спричиняє зниження активності ферменту, а це робить носіїв таких алелей більш чутливими до несприятливого екзогенного впливу [3-5]. Недоліком прогнозування екопатології за допомогою молекулярно-генетичного методу є складність виконання і висока вартість досліджень, відсутність достатньої кількості кваліфікованих спеціалістів, які вказують, що окислювальний стрес, який супроводжується активацією неферментативного вільнорадикального окислення та пероксидного окислення ліпідів, є універсальним механізмом реалізації токсичності ксенобіотиків на клітинному рівні [8, 9]. Це, на нашу думку, дозволяє використовувати виявлення продуктів таких реакцій в якості діагностичних маркерів екопатології.

Відомі способи діагностики та прогнозування важкості перебігу екологічно детермінованих захворювань у дітей дозволяють встановлювати наявність функціонально неповноцінних алелей генів детоксикації, реєструвати імунологічні відхилення, однак не дають можливості визначати ступінь індивідуальної чутливості організму дитини до певних забруднювачів довкілля. Отже, прогноз, здійснений за допомогою цих способів, буде недостатньо точним, не буде відображати індивідуальну гіперчутливість до певного ксенобіотика.

Найближчими аналогами запропонованого процесу є докторська дисертація Османова І.М., де проводиться дослідження реакції лейкоцитолізу та деяких імунологічних маркерів при екологічно детермінованих нефропатіях [10] та роботи Игнатовой М.С., Османова И.М., Хариной Е.А., Длин В.В. та Юрьевой Э.А., Раба Г.П., Алексеевой Н.В., Сафоновой О.Н., Аксеновой М.Е., які присвячені верифікації характеру еконефропатії у дітей при тривалому впливі малих доз солей важких металів та гіперчутливості до ксенобіотиків як фактору ризику розвитку еконефропатій у дітей [11-13]. Проведені дослідження стосувались тільки одного виду негативного впливу довкілля на організм та тільки одного прояву екологічно детермінованого захворювання - нефропатії.

Недоліком прототипу, який усувається запропонованим процесом, є те, що автори не

(13) U

(11) 31588

(19) UA

проводили розрахунків генетичної схильності до екопатології. Крім того, відомі способи не дають можливості прогнозування важкості перебігу екологічно детермінованих захворювань. Перевагою запропонованого способу є інформативність, специфічність, індивідуалізований підхід до діагностики та прогнозування важкості перебігу, а також - швидкість і простота виконання та невисока вартість реактивів.

Завданням корисної моделі є розробка такого процесу діагностики та прогнозування екологічно детермінованих захворювань у дітей, який би за рахунок застосування легких у виконанні та недорогих по вартості досліджень, дозволив оцінити індивідуальний ризик виникнення та характер перебігу екологічно детермінованих захворювань. Завдання вирішується тим, що дітям із забруднених регіонів оцінюють генетичний ризик розвитку захворювання за адаптованими моделями D. Falkoner та E. Edwards [14, 15], проводять клінічний огляд та ультразвукове дослідження, виконують низку лабораторних тестів, а саме реакцію специфічного лейкоцитолізу до ксенобіотиків, виділення продуктів перекисного окислення ліпідів, полярних ліпідів та тести урінолізу. Запропонований процес здійснюється наступним чином. Лікар збирає генеалогічний анамнез у сім'ях дітей, що проживають на забрудненій території. У разі наявності в сім'ї дитини з проявами екопатології, або хворого батька чи матері, інші діти в сім'ї мають бути віднесені до «групи високого» ризику формування в них екодетермінованих нефропатій, оскільки ризик виникнення у них екозахворювань відповідно до підрахунку за методом E. Edwards та коефіцієнт успадкування схильності до еконефропатії, підрахований за моделлю D. Falkoner, складає 26,14% та 33% відповідно, що оцінюється як висока ймовірність. Ризик розвитку еконефропатій для рідних сібсів дітей з екопатологією вище загально-популяційного, за наслідком розрахунку за методом E. Edwards. Дітям із забруднених регіонів проводять клінічний огляд та ультрасонографічне дослідження внутрішніх органів та щитоподібної залози для виявлення ознак хронічної неспецифічної інтоксикації, гіперплазії щитоподібної залози, дисметаболічної нефропатії. Особливу увагу приділяють огляду ротової порожнини, оскільки гіперплазія емалі зубів може свідчити про порушення засвоєння кальцію, пов'язаного з впливом ксенобіотиків. При наявності названих проявів екологічно детермінованої патології таким дітям виконують ряд лабораторних тестів, а саме – реакцію специфічного лейкоцитолізу до солей важких металів, стронцію та цезію; виділення продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та полярних ліпідів (ПЛ) з сечею та тести урінолізу (фосфатурія, аміноацидурія, глюкозурія, кальціурія), які описані у методичних рекомендаціях "Медико-генетичне консультування при нефропатіях специфічного вивільнення (1999р.). Ризик розвитку екозахворювань оцінюється на обліку кількості клітин, сенсibilізованих внаслідок дії ксенобіотиків. Для

проведення реакції необхідно 0,05-0,2мл крові, набраної з додаванням гепарину. До дослідного взірця додають специфічний фактор, після чого витримують 2 години у термостаті при 37° і порівнюють із контрольним взірцем, до якого специфічний фактор не додавали.

Специфічні фактори підбирають дослідним шляхом, зокрема в наших дослідженнях це були солі важких металів, стронцію та цезію.

Хід реакції наступний: по 0,1мл крові на гепарині розливають у 5 пробірок. 1-ша пробірка - контроль, а в решта 4 пробірки додають по 100мкл розчинів специфічних факторів ( $\text{CdCl}_2 \times 2,5\text{H}_2\text{O}$  - 1 ммоль на фізіологічному розчині,  $\text{CzCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  - 1 ммоль на фізіологічному розчині,  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})^2 \times 3\text{H}_2\text{O}$  - 0,7 ммоль на фізіологічному розчині), по 50мкл розчинів  $\text{H}_2\text{O}_2$  та  $\text{FeSO}_4$ . В контрольну пробірку додають 100мкл фізіологічного розчину. Після інкубації із кожної пробірки беруть по 0,02мл крові та додають в 0,4мл 3% розчину оцтової кислоти та, після перемішування, підраховують кількість лейкоцитів у кожній пробі.

При відсутності сенсibilізації робоча доза специфічного фактору не повинна викликати лізис інтактних клітин у кількості більшій, ніж у контролі. В середньому, клітин, що зазнали лізису, не повинно бути більше 9,9%. Низькою чутливістю вважається показник реакції нижче 20%, середньою - 20-30%, високою індивідуальною чутливістю до ксенобіотиків вважається лізис більш ніж 30% клітин. Метод визначення в сечі продуктів реакції перекисного окислення ліпідів базується на окисленні перекисами, кількість яких пропорційна вмісту продуктів ПОЛ, йодиду калію в присутності молібдату амонію, з утворенням зафарбованого йод-крохмального комплексу. Для цього в пробірку послідовно вносять 1,5мл сечі, 0,2мл 4% розчину йодиду калію, 0,2мл розчину молібдату амонію в 0,5М розчині сірчаної кислоти і 0,2мл свіже-приготованого розчину крохмалу. Контролем слугує аналогічна реакція, проведена з дистильованою водою. Поява синього забарвлення свідчить про наявність у досліджуваному зразку перекисних зв'язків, кількість яких визначають шляхом титрування проби 0,1М розчином тіосульфату натрію до зникнення забарвлення. Результат виражають в умовних одиницях, що відповідає кількості мл реактиву, який витрачено на титрування. В нормі перекиси в сечі відсутні - забарвлення не з'являється. Незначним слід вважати результат - 0,01-0,05ум.од., середнім вмістом - 0,05-0,2ум.од., значний вміст в сечі продуктів ПОЛ вважається при результаті більше 0,2ум.од. Метод визначення в сечі полярних ліпідів базується на напівкількісному визначенні появи в сечі емульсованих ліпідів, які, при додаванні хлористого калію, випадають в осад (помутніння). Для цього в пробірку послідовно вносять 5,0мл сечі, взятої з усієї кількості, зібраної за добу, і 1,0мл 10% розчину хлористого кальцію та струшують. Через дві хвилини оцінюють інтенсивність помутніння за чотирьохбальною шкалою: + - слабе, ++ - середньої інтенсивності, +++ - інтенсивне, ++++ - дуже інтенсивне. В нормі помутніння немає.

До тестів урінолізису входять проби на наявність в сечі білку (протеїнурію), амінокислот, глюкози (за пробєю Гайнеса) та кальцію (за пробєю Сулковича). Принцип якісної проби на протеїнурію полягає в осадженні білку сульфосаліциловою кислотою. Помутніння, що утворилось, вказує на наявність білку в сечі. Для цього 3-4мл профільтрованої сечі вливають в 2 пробірки (дослід та контроль). В дослідну пробірку додавають 6-8 крапель 20% розчину сульфосаліцилової кислоти. Якщо в сечі є білок, з'являється помутніння, інтенсивність якого пропорційна концентрації білку. Результат читають на темному фоні та оцінюють за чотирьохбальною шкалою: + - слабе, ++ - середньої інтенсивності, +++ - інтенсивне, ++++ - дуже інтенсивне. В нормі помутніння немає.

Принцип тесту на наявність амінокислот оснований на ацидометричному титруванні сечі ОД Н розчином їдкого натра в присутності фенолфталеїна (індикатор). Для цього в плоскодонну колбу на 50мл вносять 10мл сечі, прибавляють 2-3 краплі 0,1% спиртового розчину фенолфталеїна та титрують 0,1N розчином їдкого натра до появи слабкого рожевого забарвлення. Потім доливають 5мл формолового реактиву та, періодично помішуючи, ставлять на 5 хвилин при кімнатній температурі. Після цього титрують 0,1N розчином їдкого натру до незникаючого протягом 30 секунд червоного забарвлення. Помічають кількість мл 0,1N розчину їдкого натра, що витратили на титрування. Результат оцінюють за чотирьохбальною шкалою: + - слабе, ++ - середньої інтенсивності, +++ - інтенсивне, ++++ - дуже інтенсивне. В нормі забарвлення немає.

Для проведення тесту на глюкозу (проба Гайнеса) декілька крапель сечі додають у пробірку з невеликою кількістю порошку, який приготовано із рівних частин сірчанокислої міді ( $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) та вуглекислого натрію ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Суміш підігрівують до закипання та охолоджують. Реакція позитивна при зміні яскраво-голубого забарвлення порошку на жовто-зелене або коричневе, в залежності від кількості глюкози в сечі. При 0,5% глюкози колір проби синьо-зелений, при 2% глюкози - жовтий, при 4% глюкози - коричневий.

Для проведення проби Сулковича (тест на кальцій) до 0,5мл сечі доливають 0,5мл реактива Сулковича (2,5г щавелевої кислоти, 2,5г щавлевокислого амонію та 5мл льодяної оцтової кислоти, розчинених у дистильованій воді так, що кінцевий об'єм розчину складає 150мл). Через 1-2 хвилини після змішування рідин, оцінюють отримане помутніння. Ступінь помутніння порівнюють з профільтрованою сечею цього ж хворого та оцінюють за шкалою від 0 до ++++. Легке помутніння (0 - + - ++ ) спостерігається при вмісті кальцію менше, ніж 7,5мг %, значне - (+++ - ++++) - при концентраціях вище 10мг %.

Патологічні результати цих тестів можуть свідчити про формування у дитини, що проживає в умовах забрудненого довкілля, екологічно-детермінованої патології. Чим більше виражені зміни у лабораторних показниках, тим більш важку форму захворювання можна прогнозувати.

До переваг цих методик слід віднести простоту їх виконання, невисоку вартість реактивів та достатню чутливість. Виконання аналізів за такими методиками може бути налагоджено в умовах районної лікарні.

Приклад 1. Пацієнт Володимир З., 1995р.н., постійно проживає у м. Соснівка Львівської області, забрудненому солями важких металів та фтором. Старший брат страждає на гіпоплазію емалі зубів та хронічних дизметаболических порушень. При клінічному огляді блідий, наявна гіпоплазія емалі зубів II-III ступеню, зоб Іст., відмічається помірна болючість живота при пальпації, симптом Пастернацького позитивний з обох боків. Індивідуальний прогноз виникнення екодетермінованої патології, зумовленої поступленням через шлунково-кишковий тракт солей важких металів та фтору, у пацієнта дорівнює 26%. Коефіцієнт успадкування схильності до еконефропатії дорівнює 33%. При проведенні реакції специфічного лізису лейкоцитів виявлена висока індивідуальна чутливість організму до солей свинцю, кадмію та ртуті (відсоток лізису лейкоцитів сягав 65%, 40% та 35% відповідно при  $N - < 20\%$ ). Екскреція сумарних продуктів ПОЛ - 1,5ум.од. ( $N - 0,0-0,03\text{ум.од.}$ ), полярних ліпідів - 1,02ум.од. ( $N - 0,0-0,2\text{ум.од.}$ ), молекул середніх розмірів - 0,375ум.од. ( $N - 0,250\pm 0,02\text{ум.од.}$ ). Тести урінолізису показали виражену фосфатурію - 25,78 моль/добу ( $N - \text{до } 9,0 \text{ моль/добу}$ ), гіпераміноацидурію - (+++) , глюкозурію - (++) та кальціурію - (+++) при відсутності цих сполук в сечі в нормі. Результати проведеного дослідження дозволяють констатувати у пацієнта з високим генетичним ризиком маніфестації екопатології наявність синдрому екологічної дезадаптації, екологічно детермінованих зобу та нефропатії та високу ймовірність виникнення екопатології.

Приклад 2. Пацієнт Марія І., 1993р.н., проживає у м. Бурштин Івано-Франківської області, де розташована теплова електростанція, яка спричиняє викид в атмосферу сірчистого ангідриду, вуглеводнів без легких органічних сполук, окислів азоту та золи сланцевої. В сім'ї хворих на хронічні захворювання нирок, зубів та шлунково-кишковий тракт не має. Дівчина при клінічному огляді бліда, гіпоплазії емалі зубів немає, щитоподібна залоза не збільшена, пальпація живота помірно болюча, симптом Пастернацького від'ємний з обох боків. Індивідуальний прогноз виникнення екодетермінованої патології, що зумовлена поступленням через дихальні шляхи інгаляційних ксенобіотиків, у пацієнта менше 20%. Коефіцієнт успадкування схильності до еконефропатії менше 20%. При проведенні реакції специфічного лізису лейкоцитів виявлена висока індивідуальна чутливість організму до солей кадмію та цезію (відсоток лізису лейкоцитів сягав 45%, 34% відповідно при  $N - < 20\%$ ). Екскреція сумарних продуктів ПОЛ - 0,05ум.од. ( $N - 0,0-0,03\text{ум.од.}$ ), полярних ліпідів - 0,10ум.од. ( $N - 0,0-0,2\text{ум.од.}$ ), молекул середніх розмірів - 0,150ум. од. ( $N - \text{до } 0,250\pm 0,02\text{ум.од.}$ ). Тести урінолізису показали помірну фосфатурію - 11,31 моль/добу ( $N - \text{до } 9,0$

моль/добу), відсутність гіпераміноацидурії - (-) , слабкі глюкозурию - (+) та кальціурию - (+) при відсутності цих сполук в сечі в нормі. Результати проведеного дослідження дозволяють констатувати у пацієнта з низьким генетичним ризиком виникнення екопатології наявність синдрому екологічної дезадаптації, високої сенсibiлізації до солей кадмію та цезію, але через відсутність генетичної схильності та низькою індивідуальною чутливістю до ксенобіотиків, екологічно детермінованої патології у пацієнтки не зважаючи на сенсibiлізацію, не розвинулось, проте, якщо екопатологія й виникне, то її перебіг буде легким.

Приклад 3. Ярина К., 2003р.н., постійно проживає у м.Стецева, Снятинський район Івано-Франківської області, який відноситься до зони радіаційного забруднення після Чорнобильської катастрофи (щільність забруднення території радіонуклідами складає за цезієм - 4,60Кі/км<sup>2</sup> та за стронцієм - 0,31Кі/км<sup>2</sup>). Старші сестра та брат страждають на гіоплазію емалі зубів, зоб II ступеню та дизметаболічну нефропатію. У батька - сечокам'яна хвороба.

Дівчина при клінічному огляді бліда, пара орбітальний ціаноз, апетит знижений, мигдалики різко гіпертрофовані, язик обкладений сірим нальотом, наявна гіоплазія емалі зубів II ступеню, тони серця помірно приглушені, пальпація живота дещо болюча, симптом Пастернацького слабопозитивний з обох боків. Індивідуальний прогноз виникнення екодетермінованої патології, що зумовлена радіаційним навантаженням, у пацієнта дорівнює 26%. Коефіцієнт успадкування схильності до еконефропатії дорівнює 33%. При проведенні реакції специфічного лізису лейкоцитів виявлена висока індивідуальна чутливість організму до солей кадмію, цезію та стронцію (відсоток лізису лейкоцитів сягав 55%, 30% та 75% відповідно при N - <20%). Екскреція сумарних продуктів ПОЛ - 2,05ум.од. (N - 0,0-0,03ум.од.), полярних ліпідів - 1,75ум.од. (N - 0,0-0,2ум.од.), молекул середніх розмірів - 0,655ум.од. (N - 0,250±0,02ум.од.). Тести урінолізису показали виражену фосфатурию - 30,25 моль/добу (N - до 9,0 моль/добу), гіпераміноацидурію - (+++), глюкозурию - (++) та кальціурию - (+++) при відсутності цих сполук в сечі в нормі. Результати проведеного дослідження дозволяють констатувати у пацієнта з високим генетичним ризиком маніфестації екопатології наявність синдрому екологічної дезадаптації. В силу малого віку і відповідно ще не тривалого контакту з ксенобіотиком у дитині ще не розвинулась повна картина екологічно детермінованої патології, але ймовірність її виникнення та важкого полісистемного перебігу дуже висока. Розробленого способу з більшою вірогідністю можна прогнозувати ризик виникнення та важкість перебігу екологічно детермінованих захворювань дітей шляхом аналізу даних генеалогічного анамнезу та проведення простих у виконанні лабораторних тестів, які можна здійснювати в умовах лабораторії районної лікарні.

Перелік посилань:

1. Спицын В.А., Макаров СВ., Пай Г.В., Бычкова Л.С. Полиморфизм в генах человека, ассоциирующихся с биотрансформацией ксенобиотиков// Вестник ВОГиС. - 2006. - Том 10, №1. - С.97-105.

2. Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, Baranova H, Bathum L, Benhamou S, Boffetta P, et al. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations// Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. - 2001. - №10. - P.1239-1248.

3. Samir N., Kelada L, David L., Eaton I., Sophia S., Nathaniel R., Rothman S and Muin J. Khoury. The Role of Genetic Polymorphisms in Environmental Health // Environ Health Perspect.-2003.-Xo 1116 P. 1055-1064.

4. Hayes JD, Strange RC. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences // Pharmacology. - 2000. - №61. - С. 154-166.

5. Autrup H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response // Mutat Res. - 2000. - №464. - P. 65-76.

6. Каладзе М.М., Кулик Г.Д., Стукалюк В.І. Стан імунітету регуляції у дітей із екологічно несприятливих регіонів України// Педіатрія, акушерство і гінекологія. - 1996. - №2. - С.16-18. Методы донозологической диагностики экологически обусловленных заболеваний// Ю.А. Рахманин, Р.И. Михайлова, Н.В. Зайцева, Я.И. Вайсман// Гигиена и санитария. - 2001. - №5. - С.58-61. 8. Гончарук Є.Г., Коршун М.М. Вільнорадикальне окислення як універсальний неспецифічний механізм пошкоджуючої дії шкідливих чинників довкілля// Журн. АМН України, 2004, т.10, №1. - С.131-150.

9. Состояние перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты у детей с ожирением// Н.В. Болотова, А.П. Аверьянов, Н.Б.Захарова и др.// Педіатрія. - 2006. - №4. - С.11-15.

10. Османов И.М. Клинико-патогенетические особенности и тактика лечения поражений почек у детей в экологически неблагоприятных регионах. Автореф. докт. дисс. ... -М.: - 1996. - 46с.

11. Характер еконефропатий у дітей при длительном воздействии малых доз солей тяжелых металлов и возможности терапии/ Игнатова М.С., Османов И.М., Харина Е.А., Длин В.В.// Сб. лекций и статей "Экопатология детского возраста". -М.: 1995. - С.196-200.

12. Гиперчувствительность ко ксенобиотикам как фактор риска развития еконефропатий у детей. / Юрьева Э.А., Раба Г.П., Алексеева Н.В., Сафонова О.Н., Аксенова М.Е., Сумакова И.А., Османов И.М.// Нефрология и диализ. - 2000, Т2. - №4. - С.316.

13. Характер еконефропатий у дітей при длительном воздействии малых доз солей тяжелых металлов и возможности терапии/ Игнатова М.С., Османов И.М., Харина Е.А., Длин В.В.// Сб. лекций и статей "Экопатология детского возраста". -М.: 1995. - С.196-200.

14. Edward's G.H. The simulation of mendelism// Acta Genet. Statist. Med- 1960- Vol. 10-p. 63-70.

15. Falconer D.S. The inheritance of liability to certain diseases, estimated from the incidence among relatives// Ann. of Human Genetics.- 1965.- Vol. 29, N1.- p. 51-76.

