

УДК: 616.36-002:616.523-053.2:612.017.1

B.O. Шадрин¹, В.Е. Досенко²

МикроРНК как диагностические биомаркеры поражения печени при Эпштейн–Барр вирусных гепатитах у детей

¹Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца, г. Киев, Украина

²Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАМН Украины, г. Киев

SOVREMENNAYA PEDIATRIYA. 2015.1(65):115-119; doi 10.15574/SP.2015.65.115

Цель: оценка уровня miRNA-21-3р и miRNA-885-5р в сыворотке крови детей с гепатитами EBV-этиологии.

Пациенты и методы. Проанализированы результаты клинико-лабораторных и инструментальных исследований 23 детей с гепатитом EBV-этиологии. Показатели детей с EBV-гепатитом сопоставлялись с показателями 20 практически здоровых детей аналогичного возраста. Комплекс исследований включал анализ анамнестических данных, клинико-параклинические данные. Диагностика вирусных EBV-гепатитов проводилась на основе ИФА определения специфических антител к вирусу классов M и G, ДНК EBV в крови и слюне методом ПЦР. Степень активности воспалительного процесса определялась по уровню трансаминаз (АЛТ и АСТ). Уровень miRNA-21-3р и miRNA-885-5р в сыворотке крови определяли по методике TaqMan.

Результаты. Выявлено достоверное повышение содержания miRNA-21-3р в сыворотке крови детей с EBV-гепатитами: 21,8375 (1,1439; 2046,25) УЕ против 0,6516 (0,0133; 5,3708) УЕ в группе здоровых детей ($p < 0,05$). Содержание miRNA-885-5р не имело значимых отличий от показателей у детей контрольной группы и составило 1,0248 (0,0342; 14,5261) УЕ против 0,1801 (0,0122; 1,5653) УЕ.

Выводы. Выявленные изменения содержания miRNA-21-3р и miRNA-885-5р у детей с EBV-гепатитами указывают на возможность использования miRNA-21-3р как диагностического маркера поражения печени при EBV-инфекции.

Ключевые слова: микроРНК, Эпштейн–Барр вирус, гепатит, дети.

Введение

Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о весомом участии герпетических инфекций в поражении гепатобилиарной системы у детей [1]. Одним из активно изучаемых за последнее десятилетие является Эпштейн–Барр вирусный (EBV) гепатит, механизмы формирования которого до конца не изучены, а данные о течении и исходе до сих пор разноречивы. Поражения печени, вызванные EBV, в настоящее время встречаются не только у иммунодефицитных пациентов, но и иммунокомпетентных больных, имеют тенденцию к росту и формированию хронических форм [2].

О течении EBV-гепатита в литературе представлены сведения, связанные преимущественно с клинически выраженной формой инфекции — инфекционным мононуклеозом. Наиболее высокая заболеваемость инфекционным мононуклеозом регистрируется в возрасте от 3 до 13 лет, а поражения печени не имеют клинико-параклинических отличий от вирусных гепатитов другой этиологии [4]. Брожденные EBV-поражения печени встречаются редко, некоторые авторы рекомендуют рассматривать EBV-гепатиты как отдельную нозологическую форму, вне связи с инфекционным мононуклеозом [6]. Развитие хронического гепатита и цирроза печени, согласно литературным данным, не характерны [5], однако в последние годы имеются сообщения о хроническом, в том числе первично хроническом, течении гепатита, вызванного EBV [6].

Приведенные литературные данные свидетельствуют о важной роли EBV в формировании патологии печени, однако механизмы развития возникающих нарушений при EBV-гепатите до настоящего времени еще недостаточно изучены. Иммунологическая незрелость в детском возрасте обуславливает патогенетические процессы в печени, которые в большинстве случаев приобретают хроническое течение. Выраженность изменений биохимических показателей не всегда коррелирует со степенью прогрессирования и прогнозом заболевания, что диктует необходимость

проведения исследований, характеризующих степень вовлечения органа в патологический процесс.

В последние годы проводятся многочисленные исследования по определению участия и диагностической ценности малых некодирующих молекул РНК (miRNAs) в формировании заболеваний. miRNAs являются молекулами, которые регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. Доказано, что miRNAs потенциально регулируют каждый аспект клеточной активности, в том числе дифференцирование, развитие, метаболизм, пролиферацию и апоптоз клеток, включая участие в течении вирусных инфекций [8]. Циркулирующие в сыворотке miRNAs стабильны и защищены от разрушения в жидкостях тела, что делает их универсальными биомаркерами при многих заболеваниях [9].

Использование miRNAs в качестве неинвазивных биомаркеров представляет особый интерес при заболеваниях печени [10]. Исследования последних лет показали, что miRNAs экспрессируются в печени и модулируют разнообразный спектр ее функций [13]. Нарушение регуляции экспрессии miRNAs может быть основным патогенным фактором многих заболеваний печени, в том числе вирусного гепатита, гепатоцеллюлярной карциномы, поликистоза печени. Согласно последним научным данным, miRNAs являются потенциальными маркерами диагностики и мониторинга состояния печеночной ткани, включая процессы фиброза и канцерогенеза [13,14,17]. Предполагается, что молекулы miRNA участвуют в регулировании и дифференцировании всех видов клеток печеночной ткани, включая клетки Купфера. Так, например, ингибирование экспрессии miRNA-122 в печени у мышей приводит к снижению холестеринового и липидного метаболизма, miRNA-181 представлена в большом количестве в эмбриональной печени и является одной из важнейших miRNA, регулирующих органогенез печени [22]. Недавние исследования указывают на участие miRNA-155, miRNA-29, miRNA-199 в экспрессии фактора роста гепатоцитов

(HGF), тумонекротизирующего фактора альфа (TNF- α), что способствует формированию фибротических изменений в печеночной ткани [15,17,19].

Избыточная экспрессия различных специфических miRNAs может замедлять или стимулировать печеночный фиброз печени [21]. Так, регулирование miRNA-21 может способствовать прогрессированию гепатоцеллюлярной карциномы [18]. Установлено, что повышенная экспрессия miRNA-21 способствует фиброзу, стимулируя SMAD-сигнальный каскад трансформирующего фактора роста (TGF- b) — ключевого медиатора фиброгенеза и экспрессию молекулы матриксной металлопротеиназы-2 (MMP-2), которая обеспечивает деградацию молекул межклеточного матрикса и инфильтрацию фибробластов [11]. Исследования на животных доказывают, что функциональная модуляция miRNA-21 стимулирует клеточную пролиферацию и жизнедеятельность гепатоцитов, а также снижает гибель клеток. Исследуя специфические ингибиторы miRNA-21, выявлено снижение интенсивности клеточной пролиферации и жизнедеятельности клеток печени, что определяет функциональный эффект данной miRNA [7].

Последними исследованиями показано, что в сыворотке больных с гепатоцеллюлярной карциномой, циррозом печени и хроническим гепатитом В определяется достоверно высокий уровень экспрессии miRNA-885 по сравнению с больными раком желудка и здоровыми [20]. Другими исследователями подтверждена повышенная экспрессия miRNA-885 у детей и взрослых с хроническим гепатитом В [12].

Таким образом, специфические miRNAs играют причинную роль в формировании и течении заболеваний печени. Исследования в области экспрессии miRNAs при вирусных гепатитах В и С указывают на участие их в подавлении роста вирусов и воспаления [16]. Однако отсутствуют данные об участии miRNAs в этиопатогенезе герпесвирусных заболеваний печени. В данной работе мы исследовали роль miRNA-21-3р и miRNA-885-5р при EBV-гепатитах у детей.

Целью исследования явилась оценка уровня miRNA-21-3р и miRNA-885-5р в сыворотке крови детей с гепатитами EBV-этиологии.

Материал и методы исследования

Для решения поставленной задачи были проанализированы результаты клинико-лабораторных и инструментальных исследований 23 детей с гепатитом EBV-этиологии. Результаты показателей детей с EBV-гепатитом сопоставлялись с показателями 20 практически здоровых детей аналогичного возраста. Комплекс исследований включал анализ анамнестических данных, клинический осмотр, общеклинические анализы крови, данные биохимических исследований крови, ультразвуковое исследование органов брюшной полости. С целью уточнения этиологического фактора проводилось обследование больных на TORCH-инфекции, маркеры вирусного гепатита В и С, RW и ВИЧ, определение уровней а-1-антитрипсина, глюкозы и галактозы крови, аминокислотный спектр крови и мочи с последующей консультацией генетика. Диагностика вирусных EBV-гепатитов проводилась на основе иммуноферментного анализа определения специфических антител к вирусу классов M и G (anti-EBV Ig M и anti-EBV Ig G), ДНК EBV в крови и слюне методом ПЦР. Степень активности воспалительного процесса определялась по уровню трансаминаз (АЛТ и АСТ): 1,5–2 нормы — минимальная, 3–5 норм — слабовыраженная, 5–9 норм — умеренная, 10 норм и более — высокая [3].

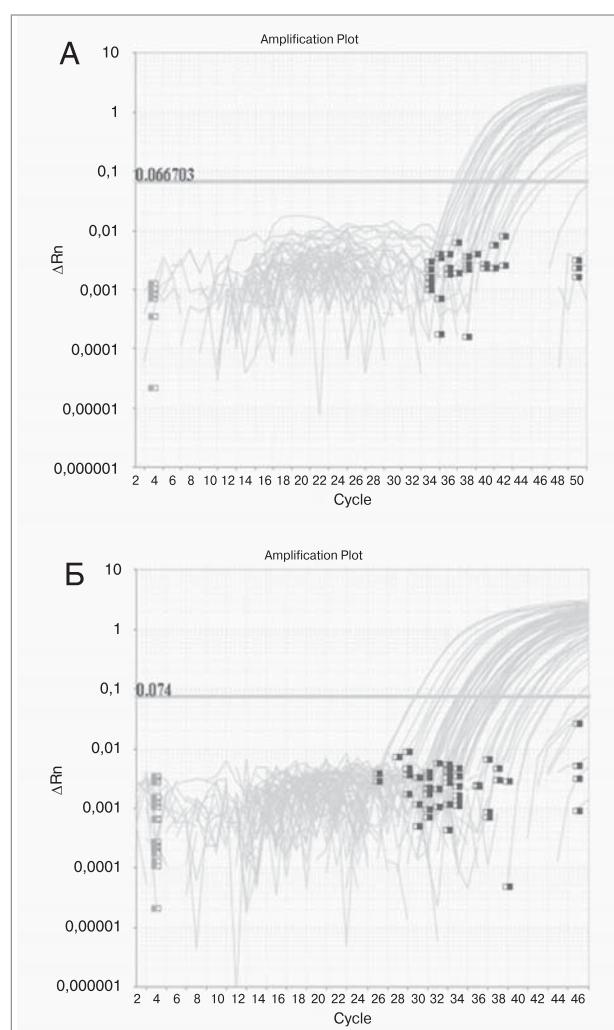


Рис. 1. Результаты оценки уровня miRNAs у детей с гепатитами: А — miRNA-21-3р, Б — miRNA-885-5р

Уровень miRNA-21-3р и miRNA-885-5р в сыворотке крови детей с гепатитами и здоровых определяли с применением методики TaqMan. Тотальную РНК выделяли из крови больных с использованием mirVana PARIS (Ambion, США) в соответствии с протоколом изготовителя. Концентрацию РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop ND1000 (NanoDrop Technologies, США). miRNAs определяли методом обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США), специфичных праймеров для каждой микроРНК и 10 нг тотальной РНК. Количественную ПЦР в реальном времени проводили с использованием TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems, USA): U6 snRNA (как эндогенный контроль), hsa-miR-21-3p, has-885-5p. Температурный режим был таким: инициальная денатурация 95°C — 10 мин; 45 циклов 95°C — 15 с и 60°C — 60 с. Уровень miRNA рассчитывали по формуле $(2^{\Delta Ct} \cdot 100)$, нормализовали к U6 snRNA и представляли в условных единицах. Амплификацию проводили на 7500 Fast Real-time PCR (Applied Biosystems, США). Полученные данные (рис. 1 А, Б) были проанализированы с помощью программного обеспечения 7500 Fast Real-time PCR и отображены в виде графиков.

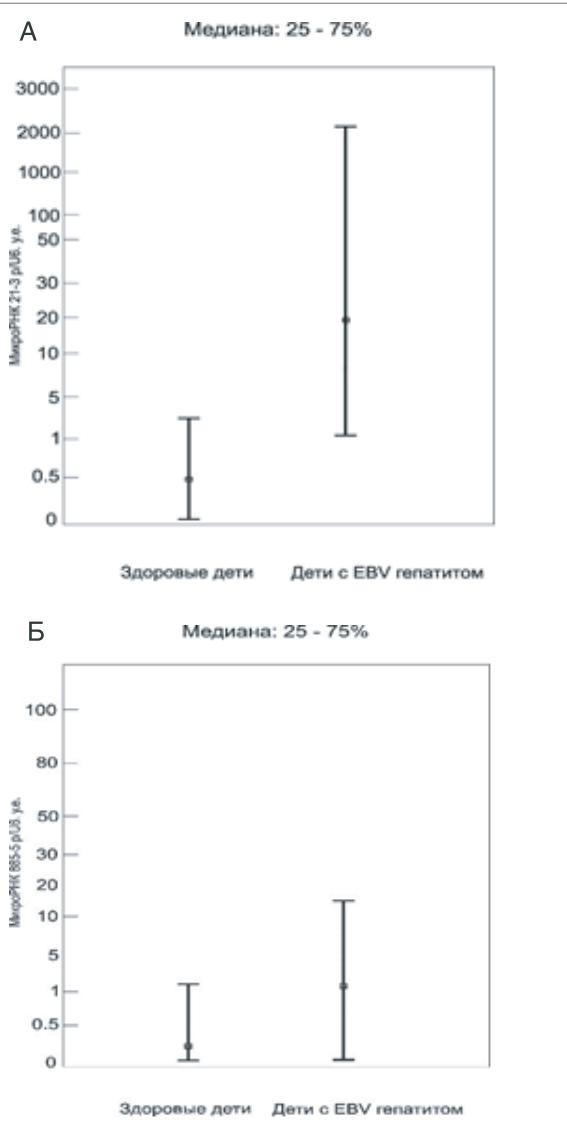


Рис. 2. Медиана и дисперсия уровня miRNAs в сыворотке детей с гепатитом EBV-этиологии и контрольной группы (УЕ): А — miRNA-21-3p, Б — miRNA-885-5p

Полученные цифровые данные обрабатывались при помощи компьютерных программ Microsoft Office 2007 и Statistica 6 (StatSoft Inc., США). За критическое значение уровня значимости принимали 5%. Анализ соответствия распределения закону нормального распределения признаков выполнен с использованием критерия Шапиро—Уилка (в случае miRNA-21-3p — $W=0,3503$ ($p=0,0152$), miRNA-885-5p $W=0,2448$ ($p=0,0106$)); при $p<0,05$ распределение признака отличается от нормального. Учитывая, что W -статистика была значимой ($p<0,05$), то вероятность различий в выборках проводили непараметрическим методом (расчет U-критерия Манна—Уйтни). Экспрессия исследуемых микроРНК представлена в виде

Таблица 1
Показатели течения гепатита у обследованных детей

| Показатель | EBV – гепатит |
|---|---------------|
| Пол (мальчики/девочки) | 14/9 |
| Возраст (мес./лет) | 8,7±3,1 (лет) |
| Общий билирубин, мг/дл | 75±12,8 |
| Прямой билирубин, мг/дл | 26±8,4 |
| АЛТ, ед/л | 72,3±29 |
| АСТ, ед/л | 45,0±14,5 |
| Длительность процесса на момент исследования, дни | 7,5±2,0 |

медианы и перцентилей (25, 75). Корреляционная связь рассчитывалась по ранговому коэффициенту корреляции Спирмена.

Результаты исследования и их обсуждение

В большинстве случаев (92,1%) EBV-гепатит проявлялся у детей после перенесенной EBV-инфекции, в период острых клинических проявлений.

Характеристика пациентов и результаты анализа биохимических показателей сыворотки крови обследованных с EBV-гепатитами детей представлены в таблице.

Статистический анализ не выявил корреляционной связи между уровнем исследуемых miRNAs и трансаминаз у детей с EBV-гепатитами: в случае АЛТ для miRNA-21-3p — $r_s=0,72$ ($p=0,78-0,98$), для miRNA-885-5p — $r_s=0,34$ ($p=0,41-0,75$), в случае АСТ для miRNA-21-3p — $r_s=0,53$ ($p=0,76-0,85$), для miRNA-885-5p — $r_s=0,16$ ($p=0,35-0,42$) ($p>0,05$). Полученный результат указывает на то, что степень повышения уровня miRNA-21-3p и miRNA-885-5p при EBV-гепатитах не зависит от степени гепатоцитолиза.

Выходы

Одной из важных функций miRNAs является контроль репликации вирусов во время инфицирования клетки и его персистенции. Функция miRNA-21-3p предполагает, согласно литературным данным, стимуляцию клеточной пролиферации и жизнедеятельности гепатоцитов. Поражение печени EBV сопровождается повышением уровня miRNA-21-3p, что, возможно, не только отражает выраженные нарушения иммунной регуляции в печеночной ткани при герпесвирусных поражениях, но и указывает на определяющую роль miRNA-21-3p как регулятора иммунного ответа. Экспрессия miRNA-885-5p, согласно исследованиям, определяется профиброгенным ответом в отношении паренхимы печени. Отсутствие значимых изменений по уровню miRNA-885-5p, возможно, указывает на благоприятный прогноз течения гепатита на фоне клинически выраженной формы EBV-инфекции у детей, однако не может быть использовано как прогностический признак течения патологии, ввиду отсутствия взаимосвязи активности процесса и уровня исследуемых miRNAs.

Таким образом, выявленные изменения содержания miRNA-21-3p и miRNA-885-5p у детей с EBV-гепатитами указывают на возможность использования miRNA-21-3p как диагностического маркера поражения печени при EBV-инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Герпесвирусные гепатиты у детей / Учайкин В. Ф., Смирнов А. В., Чулов С. Б., Россина А. Л. // Педиатрия. — 2012. — Т. 91, № 3. — С. 136—142.
2. Классификация хронического гепатита: диагностика, определение степени тяжести и стадии течения / Desmet V., Gerber M., Hoofnagle J. H. [et al.] // Рос. журн. Гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. — 1995. — № 2. — С. 38—45.
3. Современные критерии диагностики и подходы к лечению хронического гепатита у детей : метод. реком. — К., 2010. — 41 с.
4. Хмилевская С. А. Изменение функционального состояния печени при Эпштейна—Барр вирусном мононуклеозе у детей / С. А. Хмилевская, И. А. Зайцева, Е. В. Михайлова // Саратовский науч.-мед. журн. — 2009. — Т. 5, № 4. — С. 572—577.
5. Шерлок Ш. Заболевания печени и желчных путей : практическ. рук-во : пер. с англ. / Ш. Шерлок, Дж. Дули; под ред. З. Г. Апросиной, Н. А. Мухиной. — М. : ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1999. — 864 с.
6. Эпштейна—Барр вирусный гепатит у детей / В. Ф. Учайкин, А. В. Смирнов, С. Б. Чулов [и др.] // Актуальные вопросы детской патологии и вакцинопрофилактики у детей : мат. конгр. — СПб. : Спец. лит., 2008. — С. 148.
7. Castro R. E., Ferreira D. M., Zhang X. [et al.] // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. — 2010. — Vol. 229 (4). — P. 887—897.
8. Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases / Bala S., Petrasek J., Mundkur S. [et al.] // Hepatology. — 2012. — Vol. 56. — P. 1946—1957.
9. Circulating microRNAs: molecular microsensors in gastrointestinal cancer / Blanco-Calvo M., Calvo L., Figueiro A. [et al.] // Sensors (Basel). — 2012. — Vol. 12. — P. 9349—9362.
10. Cermelli S. Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease / S. Cermelli, A. Ruggieri, J. A. Marrero // PLoS One 6. — 2011. — e23937.
11. Correlation between microRNA expression levels and clinical parameters associated with chronic hepatitis C viral infection in humans / Marquez R. T., Bandyopadhyay S., Wendlandt E. B. [et al.] // Lab Invest. — 2010. — Vol. 90. — P. 1727—1736.
12. Differential plasma MicroRNK Profiles in HBeAg Positive and HBeAg Negative Children with Chronic Hepatitis B / Winter T. N., Bang-Berthelsen C. H., Heiberg I. L., [et al.] // PLOS ONE. — 2013. — Vol. 8, Issue 3. — P. 58236.
13. Gao B. and Battalier R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets / B. Gao // Gastroenterology. — 2011. — Vol. 141. — P. 1572—1585.
14. Genomewide microRNA down-regulation as a negative feedback mechanism in the early phases of liver regeneration / Shu J., Kren B. T., Xia Z. [et al.] // Hepatology. — 2011. — Vol. 54. — P. 609—619.
15. Hepatocyte growth factor (HGF) inhibits collagen I and IV synthesis in hepatic stellate cells by miRNA-29 induction / Kwiecinski M., Noetel A., Elfimova N. [et al.] // PLoS One. — 2011. — Vol. 6. — e 24568.
16. MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer / Ji J., Shi J., Budhu A. [et al.] // N. Engl. J. Med. — 2009. — Vol. 361. — P. 1437—1447.
17. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis / Roderburg C., Urban G. W., Bettermann K. [et al.] // Hepatology. — 2011. — Vol. 53. — P. 209—218.
18. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer / Meng F., Henson R., Wehbe-Janek H. [et al.] // Gastroenterology. — 2007. — Vol. 133. — P. 647—658.
19. Positive regulation of hepatic miR-122 expression by HNF4alpha / Li Z. Y., Xi Y., Zhu W. N. [et al.] // J. Hepatol. — 2011. — Vol. 55. — P. 602—611.
20. Serum microRNA characterization identifies miR-885—5p as a potential marker for detecting liver pathologies / Gui J., Tian Y., Wen X. [et al.] // Clin. Sci (Lond). — 2011. — Vol. 120. — P. 183—193.
21. Suppression of hepatic stellate cell activation by microRNA-29b / Sekiya Y., Ogawa T., Yoshizato K. [et al.] // Biochem Biophys Res Commun. — 2011. — Vol. 412. — P. 74—79.
22. Zaret K. S. Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis / K. S. Zaret // Nat Rev Genet. — 2002. — Vol. 3. — P. 499—512.

МікроРНК як діагностичні біомаркери ураження печінки**при Епштейн—Барр вірусних гепатитах у дітей****В.О. Шадрін¹, В.Є. Досенко²**¹Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, м. Київ, Україна²Інститут фізіології ім. А. А. Богомольця НАМН України, м. Київ**Мета:** оцінка рівня miRNA-21-3p i miRNA-885-5p у сироватці крові дітей з гепатитами EBV-етіології.

Пациєнти і методи. Проаналізовано результати клініко-лабораторних та інструментальних досліджень 23 дітей з гепатитом EBV-етіології. Результати показників дітей з EBV-гепатитом порівнювались з показниками 20 практично здорових дітей аналогічного віку. Комплекс досліджень включав аналіз анамнестичних та клініко-параклінічних даних. Діагностика вірусних EBV-гепатітів проводилася на основі ІФА для визначення специфічних антитіл до віруса класів M і G, ДНК EBV у крові і слині методом ПЛР. Ступінь активності запального процесу визначався за рівнем трансаміназ (АЛТ і АСТ). Рівень miRNA-21-3p i miRNA-885-5p в сироватці крові дітей з гепатитами і здорових визначали із застосуванням методики TaqMan.

Результати. Виявлено достовірне підвищення рівня miRNA-21-3p в сироватці крові дітей з EBV гепатитами: 21,8375 (1,1439; 2046,25) УО проти 0,6516 (0,0133; 5,3708) УО в групі здорових дітей ($p < 0,05$). Рівень miRNA-885-5p не мав суттєвих відмінностей проти дітей контрольної групи і склав 1,0248 (0,0342; 14,5261) УО проти 0,1801 (0,0122; 1,5653) УО. Статистичний аналіз у дітей з EBV-гепатитами не виявив кореляційного зв'язку між рівнем досліджуваних miRNAs і рівнем АЛТ і АСТ ($p > 0,05$).

Висновки. Виявлені зміни вмісту miRNA-21-3p i miRNA-885-5p у дітей з EBV-гепатитами вказують на можливість використання miRNA-21-3p як діагностичного маркера ураження печінки при EBV-інфекції.

Ключові слова: мікроРНК, Епштейна—Барр вірус, гепатит, діти.

SOVREMENNAYA PEDIATRIYA. 2015.1(65):115-119; doi 10.15574/SP.2015.65.115

MicroRNA as diagnostic biomarkers of liver damage at Epstein-Barr viral hepatitis in children

V.O. Shadrin¹, V.E. Dosenko²

¹A.A. Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

²A.A. Bogomolets Institute of Physiology of the NAMS of Ukraine, Kiev

Objective: To assess the level of miRNA- 21-3p and miRNA 885-5p in the serum of children with hepatitis of EBV-etiiology.

Patients and methods. The results of clinical, laboratory and instrumental studies of 23 children with hepatitis of EBV-etiology are analyzed. Indicators of children with EBV-hepatitis were compared with the rates of 20 healthy children of the same age. A set of studies included the analysis of anamnestic data, clinical and preclinical data. Diagnosis of viral EBV hepatitis was carried out on the base of ELISA detection of specific antibodies to the M and G class virus, EBV DNA in the blood saliva and by PCR method. The degree of inflammatory activity was determined by the level of transaminases (ALT and AST). The level of miRNA-21-3p and miRNA-885-5p in the blood serum was determined by the method of TaqMan.

Results. A significant increase of miRNA-21-3p in the blood serum of children with EBV-hepatitis: 21.8375 (1.1439; 2046.25) CU against 0.6516 (0.0133, 5.3708) CU in the group of healthy children ($p < 0.05$). The content of miRNA-885-5p had no significant difference from the data of the control group and was 1.0248 (0.0342, 14.5261) CU against 0.1801 (0.0122, 1.5653) CU.

Conclusions. Identified changes in the content of miRNA-21-3p and miRNA- 885-5p in children with EBV-hepatitis indicate the possibility of use of miRNA-21-3p as a diagnostic marker of liver injury during the EBV-infection.

Key words: microRNA, Epstein-Barr virus, hepatitis, children.

Сведения об авторах:

Шадрин Валерий Олегович — аспирант каф. детских инфекций НМУ им. А.А. Богомольца. Адрес: г. Киев, ул. Дегтяревская, 12; тел. (044) 483-74-62.

Досенко Виктор Евгеньевич — д.мед.н., проф. каф. патофизиологии Института физиологии им. А.А Богомольца НАМН Украины. Адрес: г. Киев, ул. Богомольца, 4; тел. (044) 256-24-81; e-mail: dosenko@biph.kiev.ua.

Статья поступила в редакцию 16.01.2015 г.

НОВОСТИ

Новый метод подскажет за считанные часы, какие лекарства лучше выбрать для лечения рака

Технология, получившая название Dynamic BH3 Profiling, или DBP, сообщает в течение 16 часов результаты анализов, которые помогают узнавать, что происходит с клетками под влиянием того или иного лекарства.

DBP специально разработана для того, чтобы на ранних стадиях определять особенность процессов, происходящих с раковой клеткой. Тест способен определять признаки, подтверждающие запуск процесса

самоуничтожения клетки путем апоптоза — контролируемого процесса избавления тела от потенциально опасных клеток.

Эксперты сообщили, что препараты, выдаваемые пациенту с целью увеличения скорости апоптоза, позволяют эффективно бороться с раковыми опухолями. Эксперименты на животных и людях подтвердили эффективность метода.

Источник: med-expert.com.ua