

Д.С.Сташкевич<sup>1</sup>, А.Л.Бурмистрова<sup>1</sup>, Е.Л.Иванова<sup>2</sup><sup>1</sup>Челябинский государственный университет;<sup>2</sup>Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия  
(E-mail: stashkevich\_dary@mail.ru)

## Анализ ассоциации полиморфных генов основных цитокинов с синдромом раздраженного кишечника

В статье представлены результаты исследования иммуногенетической составляющей синдрома раздраженного кишечника. Установлены особенности частот встречаемости аллелей и генотипов генов цитокинов IL-1Ra, IL-1b, IL-4, TNF $\alpha$  у больных СРК. Проведен иерархический логлинейный анализ для выявления ассоциации комбинаций генотипов с предрасположенностью к синдрому раздраженного кишечника. Установлены комбинации генотипов генов цитокинов, обладающие протекторными свойствами при СРК: внутригенная комбинация -308G/G- -863 C/A гена TNF $\alpha$  и межгенная комбинация провоспалительных цитокинов IL-1b+3953 C/C- -863C/A TNF $\alpha$ . Выявлены гендерные различия в распределении полиморфизма цитокинов у больных СРК.

*Ключевые слова:* синдром раздраженного кишечника, гастроэнтерология, иммунная система, дисбиоз кишечника, цитокины, экспрессия, иммунорегуляторы, аллели, генотип, TNF $\alpha$ .

Синдром раздраженного кишечника (СРК) является одной из наиболее актуальных проблем современной гастроэнтерологии. Особенности проблемы СРК являются: высокая распространенность полисистемных жалоб, отсутствие четких диагностических маркеров, ограничение спектра эффективных методов лечения, направленных на биологические дефекты. В большинстве работ СРК рассматривается как хронический абдоминальный симптомокомплекс [1].

Распространенность СРК в большинстве стран мира составляет в среднем 20 %, варьируя от 9 до 48 % [2]. В развитых странах Европы, Америки, в Японии, Китае обращаемость высока и распространенность заболевания достигает 30 %; в Таиланде — 5 %, в Иране — 3,4 %. Пик заболеваемости приходится на трудоспособный возраст — 30–40 лет. Соотношение женщин и мужчин среди больных, по разным данным, варьирует от 1:1 до 2:1. Средний возраст пациентов составляет 24–41 год [2].

Развитию СРК могут предшествовать личностные особенности, обусловленные генетически или сформировавшиеся под влиянием окружающей среды [3]. В качестве генетической составляющей СРК изучаются генетический полиморфизм, вовлеченный в обмен серотонина, адренэргической и опиоидной систем, а также гены, кодирующие белки с иммуномодулирующими и/или нейромодулирующими свойствами. Среди генов-кандидатов СРК в зарубежных источниках рассматриваются: SLC6A4 — ген серотонин-транспортера, ген  $\alpha$ -2адренэргического рецептора, COMT-ген катехол-О-метилтрансферазы, GNB3 — ген  $\beta$ 3 субъединицы G-белка и т.д. [3].

Сегодняшние представления о патофизиологии СРК позволяют предположить, что в основе запуска или усиления патологического процесса лежит комбинация факторов — недостаточная или избыточная активация иммунной системы и дисбиоз кишечника. Участие цитокинов в патофизиологических процессах при СРК подтверждают данные лабораторных исследований: снижена экспрессия иммунорегуляторных цитокинов и повышена экспрессия провоспалительных цитокинов [4–6].

В связи с тем, что продукция цитокинов находится под генетическим контролем, можно предположить, что генетические полиморфизмы определенных цитокинов могут выступать в качестве факторов, определяющих чувствительность персоны к развитию патологии и влияющих на вариабельность клинических проявлений СРК.

Цель работы — установить распределение частот аллелей, генотипов и сочетаний генотипов генов основных цитокинов IL-1Ra, IL-1b, IL-4, TNF $\alpha$  у больных синдромом раздраженного кишечника европеоидного происхождения, проживающих на территории Челябинской области.

Задачи:

1. Оценить частоты встречаемости аллелей и генотипов IL-1Ra, IL-1b, IL-4, TNF $\alpha$  у больных СРК в сравнении с условно-здоровыми представителями русской популяции.
2. Выявить особенности распределения полиморфизма генов IL-1Ra, IL-1b, IL-4, TNF $\alpha$  в зависимости от пола у больных СРК.

3. Оценить ассоциацию межгенных и внутригенных взаимодействий L-1Ra, IL-1b, IL-4, TNF $\alpha$  в виде сочетаний генотипов генов цитокинов с восприимчивостью к СРК.

#### Материал и методы

В исследование включен 81 человек русской этнической группы с диагнозом СРК. Пациенты находились на лечении в гастроэнтерологическом отделении Дорожной клинической больницы МПС на станции «Челябинск» в период с 2001 по 2007 гг. Для диагностики заболевания использовались Римские критерии III (2007). Средний возраст начала заболевания составил  $32,8 \pm 1,4$  лет, длительность заболевания — в среднем от 3 до 10 лет у половины пациентов. Обследования пациентов проводились по утвержденным Медико-экономическим стандартам Министерства здравоохранения 1998 г.

Контрольную группу составляли потенциальные доноры костного мозга ОГУП «Челябинская областная станция переливания крови»: 213 человек, из них мужчин — 119 (55,9%), женщин — 94 (44,1%). Средний возраст составил  $34,6 \pm 0,75$  лет. Этническая принадлежность больных СРК и здоровых лиц определялась согласно рекомендациям Международного Уоркшоп (1980 г., Лос-Анджелес, США). Демографическая характеристика обследуемых групп представлена в таблице.

Т а б л и ц а

Демографическая характеристика обследуемых групп

Пол, возраст	Группа сравнения		Больные, СРК	
	213	%	81	%
Мужчины	119	55,9	23	28,4
Женщины	94	44,1	58	71,6
Средний возраст, лет	$34,6 \pm 0,75$		$41,9 \pm 1,3$	

*Характеристика исследуемых полиморфизмов.* Гены IL-1b и IL-1Ra расположены на второй хромосоме в районе 2q12 [7, 8]. Для исследования полиморфизма по одному нуклеотиду (SNP) в 5 экзоне гена IL-1b (положение +3953) использовали разновидность ПЦР – ПДРФ – анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов. В основе метода лежит ПЦР, с последующей обработкой ампликонов ферментом эндонуклеазой рестрикции Taq I при температуре +65 °C в течение 8 часов.

При гидролизе амплификационного фрагмента гена IL-1b выявлялось три фрагмента размером 550 п.н., 146 п.н. и 404 п.н. Фрагмент 550 п.н. соответствует амплификационному фрагменту, не подвергнувшемуся гидролизу, что указывает на наличие аллеля IL-1b (+3953) T, гомозиготное состояние обозначено m/m (сокращение от mutant — мутантный аллель). При наличии аллеля C происходит разрезание ампликона на два фрагмента — 146 п.н. и 404 п.н., гомозиготность по этому аллелю обозначена w/w (сокращение от wild — аллель дикого типа), а гетерозиготное состояние C/T в данном исследовании обозначено как w/m [8, 9]. Для определения полиморфизма типа варьирующего числа tandemных повторов (VNTR) в гене IL-1Ra использовали ПЦР с праймерами, фланкирующими полиморфный регион в пределах второго интрона, в котором находится VNTR участка длиной 86 п.н. В результате амплификации мы идентифицировали фрагменты ДНК размером 438, 524, 610 и 696 н.п. соответственно с 2, 3, 4 и 5 копиями tandemных повторов [8–10]. Эти аллели были обозначены как 2R, 3R, 4R и 5R в данном исследовании.

Ген IL-4 расположен на длинном плече 5 хромосомы [8, 9]. Для исследования VNTR IL-4 проводили ПЦР с праймерами, фланкирующими полиморфный регион в пределах 3-го интрона, в котором находится переменное количество tandemных повторов размером 70 н.п. В результате амплификации идентифицировали фрагменты ДНК размером 255 и 325 н.п. соответственно с 2 и 3 копиями tandemных повторов. Эти аллели были обозначены как 2R и 3R [9]. Наборы для типирования генов цитокинов синтезированы группой фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины (ИХБФМ СО РАН). Детекция полученных ампликонов проводилась методом вертикального электрофореза в 8 %-ном полиакриламидном геле.

Ген TNF $\alpha$  располагается в пределах главного комплекса гистосовместимости МНС и относится к генам HLA III класса. Он отстоит на 600 кДа от локуса HLA-B и характеризуется высоким количеством SNPs в промоторной области, наиболее известными являются положения -308, -238. Однако есть и другие полиморфизмы типа SNP, например -863, способные также влиять на экспрессию

TNF $\alpha$  [7, 11]. Типирование SNPs в гене TNF $\alpha$  – ПДРФ – анализ полиморфизма длины рестриционных фрагментов: амплификация с последующей обработкой ампликонов эндонуклеазами рестрикции NcoI (37 °C в течение 16 часов) для положения -308 (G/A), TaqI для положения -863 (65 °C в течение 8 часов). Детекция результатов — электрофорез в 8 % ПААГе.

**Статистическая обработка.** В работе использовались стандартные иммуногенетические критерии: критерий  $\chi^2$  — для 1 степени свободы и выше, критерий  $\chi^2$  с поправкой Йетса на непрерывность применялся для одной степени свободы, когда абсолютные частоты были меньше 10, критерий Фишера использовался при абсолютных частотах меньше 5. Для анализа ассоциации комбинаций генотипов с восприимчивостью к СРК применялся иерархический логлинейный анализ, в котором рассчитывался критерий максимального правдоподобия (G) и отклонения Фримана-Тьюки. Для оценки вероятности возникновения признака (заболевания или какой-то клинической характеристики) в зависимости от генетического варианта (аллеля, генотипа, комбинации генотипов) применялся критерий отношения шансов (OR) с расчетом 95 %-ного доверительного интервала (CI) — отношение шансов в одной группе к шансам этого же события в другой группе. Во всех случаях различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ , незначимыми при  $p > 0,10$ ; для промежуточных значений  $p$  ( $0,05 \leq p \leq 0,10$ ) обсуждали тенденцию к различиям [12].

### *Результаты и их обсуждение*

1. На первом этапе был проведен анализ распределения частот встречаемости аллелей и генотипов генов исследуемых цитокинов в группах больных СРК и условно-здоровых лиц русской популяции Челябинской области. Частоты встречаемости аллелей и генотипов генов IL-1Ra, IL-1b, IL-4, -308G/A TNF $\alpha$  не отличались между исследуемыми выборками. Различия были установлены только для частот аллелей и генотипов в точке -863 TNF $\alpha$  (на уровне тенденции).

Группа больных СРК характеризовалась сниженной частотой аллеля с заменой -863\*A, связанного с повышением продукции TNF $\alpha$  [11] и повышенной частотой другого — частого аллеля -863\*C (на уровне тенденции  $\chi^2 = 3,23$ ,  $p = 0,0722$  для одной степени свободы), но по критерию отношения шансов (OR) такое перераспределение частот аллелей не имеет диагностической значимости (OR = 0,57 95 %CI 0,3–1,06).

Больные СРК также отличались от условно-здоровых лиц повышенной частотой генотипа -863 CC TNF $\alpha$  (82,5 % против 72,8 %,  $\chi^2 = 2,97$ ,  $p = 0,0848$  для одной степени свободы, на уровне тенденции), но как маркер предрасположенности к СРК данный генотип выступать, вероятно, не может, так как расчет критерия OR показал, что его доверительный интервал находится в диапазоне, захватывающем единицу: OR = 1,76 95 %CI 0,92–3,39.

Таким образом, установленные изменения частот аллелей и генотипа CC полиморфного сайта -863 промоторной области гена TNF $\alpha$  могут быть особенностью группы больных СРК, но не являются маркерами группы риска СРК.

2. Вторая задача посвящена рассмотрению наличия или отсутствия изменений в частотах встречаемости аллелей и генотипов генов цитокинов у больных СРК в зависимости от пола. У женщин, больных СРК, выявлены следующие особенности.

**IL-1Ra.** Повышена частота аллеля 2R IL-1Ra (на уровне тенденции,  $\chi^2 = 2,82$ ,  $p = 0,093$  OR = 1,54, 95 % CI 0,93÷2,5) за счет увеличения количества носителей гомозиготного генотипа 2r/2r ( $p = 0,09$  OR = 2,64, 95 % CI 0,88÷7,9). Однако общий эффект взаимодействия между частотами аллелей и генотипов IL-1Ra и предрасположенностью к СРК у женщин оказался незначительным.

**IL-1b.** В ходе анализа был показан вклад +3953 SNP IL-1 $\beta$  в предрасположенность к СРК у женщин ( $G = 6,64$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,036$ ). Обнаружено, что статистически значимый эффект достигался за счет изменения частоты генотипа T/T (0 % против 9,57 % в контроле,  $p = 0,013$ ).

**TNF $\alpha$  -308 G/A.** Еще одной особенностью являлось изменение частот генотипов SNP -308 G/A TNF $\alpha$  у практически здоровых и больных СРК женщин (на уровне тенденции). Группа больных СРК характеризовалась повышенной частотой гетерозиготного генотипа -308G/A (33,9 % против 20,21 %,  $\chi^2 = 3,57$   $p = 0,06$ , OR = 2,02 95 %CI 0,96÷4,26) и пониженной частотой гомозиготного генотипа G/G -308 TNF $\alpha$  (64,41 % против 77,66 %,  $\chi^2 = 3,20$   $p = 0,07$ , OR = 0,52 95 %CI 0,25÷1,08). Однако по критерию отношения шансов такое изменение частот не имело прогностического значения для расчета вероятности развития предрасположенности к СРК у женщин.

Частоты аллелей и генотипов IL-4, -863 C/A TNF $\alpha$  не различались между исследуемыми группами.

Несмотря на то, что группа мужчин, страдающих СРК, была значительно меньше группы женщин, анализ распределения частот встречаемости аллелей и генотипов генов цитокинов у практически здоровых и больных СРК мужчин позволил выявить различия в частотах встречаемости аллелей и генотипов IL-1Ra и гомозиготного генотипа по редкому аллелю -308 A/A TNF $\alpha$ . У мужчин, страдающих СРК, чаще встречался генотип -308 A/A TNF $\alpha$  (9,09 % против 0,84 %,  $p = 0,064$ , OR = 11,8 95 % CI 0,99÷139,2), несмотря на то, что благодаря такому распределению частот общий эффект оказался значим на уровне тенденции.

Более информативными были различия в распределении частот встречаемости аллелей и генотипов IL-1Ra. У мужчин, страдающих СРК, снижены частоты аллеля 2R и его гетерозиготного генотипа 4R/2R по сравнению с контролем. Согласно критерию отношения шансов носительство аллеля с 2-кратным повтором уменьшает вероятность возникновения СРК по сравнению с носительством других аллелей IL-1Ra (OR=0,38 95 % CI 0,15÷0,94), но только в гетерозиготном состоянии вместе с аллелем 4R (OR=0,31 95 % CI 0,097÷0,97). В свою очередь присутствие аллеля 4R в гомозиготном состоянии повышает вероятность развития СРК у мужчин: для носительства аллеля 4R коэффициент OR составил 2,4 95 % CI 1,012÷5,62, для генотипа 4R/4R — OR = 3 95 % CI 1,09÷8,27.

Таким образом, выделение групп больных по полу позволило установить маркеры предрасположенности к СРК среди исследуемых генов цитокинов отдельно для женщин и мужчин, тогда как при объединении в общую выборку установленные различия нивелировались.

3. Оценка ассоциации межгенных и внутригенных взаимодействий с предрасположенностью / устойчивостью к СРК проводилась с помощью иерархического логлинейного анализа.

Установлена значимость следующих комбинаций генотипов: протекторными свойствами обладали комбинации генотипов SNPs TNF $\alpha$  -308G/G- -863 C/A (11,25 % vs 23,0 %  $\chi^2 = 4,35$ ,  $p = 0,0371$ , OR = 0,57 95 % CI 0,19–0,91), IL-1b+3953 C/C- - 863C/A TNF $\alpha$  (6,25 % vs 16,43 %  $\chi^2 = 4,29$ ,  $p = 0,0384$  OR = 0,34 95 % CI 0,13–0,9). По нашему мнению, ведущее значение в данных комбинациях отводится гетерозиготному генотипу — 863C/A TNF $\alpha$ .

#### Выводы

1. Особенность больных СРК европеоидного происхождения — повышенная частота гомозиготного генотипа -863C/C гена TNF $\alpha$ .
2. Установлены маркеры, снижающие вероятность развития СРК: у женщин — гомозиготный генотип T/T +3953 IL-1b, у мужчин — аллель 2r и генотип 4r/2r гена IL-1Ra.
3. Выявлены комбинации генотипов генов цитокинов, обладающие протекторными свойствами при СРК: внутригенная комбинация -308G/G- -863 C/A гена TNF $\alpha$  и межгенная комбинация генов провоспалительных цитокинов IL-1b+3953 C/C — - 863C/A TNF $\alpha$ .

#### Заключение

В патогенез каждого заболевания вовлекается много разных функционально взаимосвязанных генов той или иной локальной генной сети. Наряду с главными генами, провоцирующими начало болезни, всегда присутствуют другие, второстепенные, в том числе многочисленные гены-модификаторы, фенотипические эффекты которых во многом определяются средовыми факторами. К таким генам относятся гены воспаления, в частности гены цитокинов. Их идентификация, выявление характера функциональных поломок на уровне локальных генных сетей, особенностей ген-генных взаимодействий при мультифакторной патологии являются важными задачами постгеномной информатики и персонализированной медицины. Наше исследование вносит вклад в развитие представлений об иммуногенетической компоненте синдрома раздраженного кишечника.

#### Список литературы

- 1 Бурмистрова А.Л. Иммунный гомеостаз и микросимбиоз. Метаморфозы и пути развития воспалительных заболеваний. — Челябинск: Челябинский Дом печати, 1997. — 216 с.
- 2 Ивашкин В.Т., Шентулин А.А. Избранные лекции по гастроэнтерологии. — М.: Медпресс-информ, 2002. — 85 с.
- 3 Hotoleanu C., Popp R., Trifa A.P., Nedelcu L., Dumitrascu D.L. Genetic determination of irritable bowel syndrome // World Journal of Gastroenterology. — 2008. — Vol. 14, No. 43. — P. 6636–6640.
- 4 Родионова О.Н., Бабаева А.Р. Патогенетическая роль сывороточных цитокинов при синдроме раздраженного кишечника // Цитокины и воспаление. — 2011. — Т. 10., № 3. — С. 45–48.

- 5 Oscar R.-F., Hernandez-Ruiz J., Schmulson M. From cytokines to toll-like receptors and beyond — current knowledge and future research needs in irritable bowel syndrome // *Journal of Neurogastroenterology and Motility*. — 2010. — Vol. 16. — P. 363–373.
- 6 Saito Y.A., Talley N.J. Genetics of Irritable bowel syndrome // *American Journal of Gastroenterology*. — 2008. — Vol. 103. — P. 2100–2104.
- 7 Рыдловская А.В., Симбирцев А.С. Функциональный полиморфизм гена TNF $\alpha$  и патология // *Цитокины и воспаление*. — 2005. — Т. 4, № 3. — С. 4–10.
- 8 Шабалдин А.В., Филипенко М.Л., Воронина Е.Н., Глушков А.Н., Симонова Т.А. Полиморфизм генов антагониста рецептора интерлейкина-1 и интерлейкина-4 при репродуктивных нарушениях // *Иммунология*. — 2005. — № 1. — С. 6–9.
- 9 Бурмистрова А.Л., Сташкевич Д.С., Сулова Т.А., Девальд И.В., Исаканова А.О., Димчева О.Н. Молекулярно-генетический анализ полиморфизмов генов цитокинов — интерлейкина-1 $\beta$ , рецептора антагониста интерлейкина-1 и интерлейкина-4 у больных ревматоидным артритом башкирской этнической группы, проживающих в Челябинской области // *Медицинская иммунология*. — СПб.: Человек, 2007. — Т. 9, № 6. — С. 631–634.
- 10 Carreira P.E., Gonzalez-Crespo M.R., Ciruelo E. et al. Polymorphism of the Interleukin-1 Receptor antagonist gene a factor in susceptibility to rheumatoid arthritis in a Spanish population // *Arthritis & Rheumatism*. — 2005. — Vol. 52. — P. 3015–3019.
- 11 Heesen M., Kunz D., Wessjpe M. et al. Rapid genotyping for tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) -863C/A promoter polymorphism that determines TNF- $\alpha$  response // *Clinical Chemistry*. — 2004. — Vol. 50. — P. 226–228.
- 12 Sokal R.R., Rolf F.J. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. — N.Y.: Freeman & Co, 1995. — 850 p.

Д.С.Сташкевич, А.Л.Бурмистрова, Е.Л.Иванова

### Ісінген ішек синдромы мен негізгі цитокиндерде полиморфтық гендер ассоциацияларын талдау

Мақалада ісінген ішек синдромының иммуногенетикалық құрамдас бөлігін зерттеу нәтижесі көрсетілген. IL-1Ra, IL-1b, IL-4, TNF $\alpha$  цитокин гендерде аллельдер мен генотиптердің ісінген ішек синдромы бар ауруларда кездесу жиілігі анықталды. Ісінген ішек синдромына бейімділік пен генотиптердің комбинациясының байланысын анықтау үшін иерархиялық логсатылы (логлинейный) талдау жасалды. Ісінген ішек синдромы кезінде қорғаушылық қасиеті бар цитокин гендердің генотиптер комбинациясы анықталды: TNF $\alpha$  генінің -308G/G- -863 C/A генішіндегі комбинациясы және IL-1b+3953 C/C — -863C/A TNF $\alpha$  генералық комбинациясы. Ісінген ішек синдромы бар ауруларда цитокиндердің полиморфизмін үлестіруде гендерлік айырмашылықтар байқалды.

D.S.Stashkevich, A.L.Burmistrova, E.L.Ivanova

### Analysis of polymorphic genes of the major association of cytokines with irritable bowel syndrome

The results of the research of immunogenetic component of irritable bowel syndrome are shown. The peculiarities of frequencies of alleles and genotypes of cytokine genes IL-1Ra, IL-1b, IL-4, TNF $\alpha$  in patients with IBS are established. Log-Linear hierarchical analysis is conducted to identify combinations of genotypes and their association with susceptibility to irritable bowel syndrome. Mounted combination of genotypes of cytokine genes that have protective properties in IBS: intragenic combination -308G/G- -863 C/A and TNF $\alpha$  gene intergenic combination of pro-inflammatory cytokines IL-1b +3953 C/C- -863C / A TNF $\alpha$ . Gender differences in the distribution of polymorphisms of cytokines in patients with IBS are identified.

#### References

- 1 Burmistrova A.L. *Mikrosimbioz and Immune Homeostasis. Metamorphoses and ways of development of inflammatory diseases*, Chelyabinsk: Chelyabinsk Publishing House, 1997, 216 p.
- 2 Ivashkin V.T., Sheptulin A.A. *Featured lectures on Gastroenterology*, Moscow: Medpress-inform, 2002, 85 p.
- 3 Hotoleanu C., Popp R., Trifa A.P., Nedelcu L., Dumitrascu D.L. *World Journal of Gastroenterology*, 2008, 14(43), p. 6636–6640.
- 4 Rodionova O.N., Babayev A.R. *Cytokines and inflammation*, 2011, 10(3), p. 45–48.
- 5 Oscar R.-F., Hernandez-Ruiz J., Schmulson M. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 2010, 16, p. 363–373.
- 6 Saito Y.A., Talley N.J. *American Journal of Gastroenterology*, 2008, 103, p. 2100–2104.
- 7 Rydlovskaya A.V., Simbirtsev A.S. *Cytokines and inflammation*, 2005, 4(3), p. 4–10.
- 8 Shabaldin A.V., Filipenko M.L., Voronina E.N., Glushkov A.N., Simonova T.A. *Immunology*, 2005, 1, p. 6–9.

- 9 Burmistrova A.L., Stashkevich D.S., Suslova T.A., Deval'd I.V., Isakanova A.O., Dimcheva O.N. *Medical Immunology*, St. Petersburg: Chelovek, 2007, 9(6), p. 631–634.
- 10 Carreira P.E., Gonzalez-Crespo M.R., Ciruelo E. et al. *Arthritis & Rheumatism*, 2005, 52, p. 3015–3019.
- 11 Heesen M., Kunz D., Wessiepe M. et al. *Clinical Chemistry*, 2004, 50, p. 226–228.
- 12 Sokal R.R., Rolf F.J. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*, N.Y.: Freeman & Co, 1995, 850 p.

Репозиторий КарГУ