

УДК 575.16

Полиморфные варианты гена FSHR и гормональный профиль при проведении программ вспомогательных репродуктивных технологий

Лянгасова О.В.¹, Савикина К.Г.², Ломтева С.В.², Шкурат Т.П.

1 - Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону, Россия, oll@sfedu.ru

2 - ООО «Центр репродукции человека и ЭКО», г. Ростов-на-Дону, Россия

Аннотация. Целью исследования было изучение вклада полиморфизма гена рецептора фолликулостимулирующего гормона FSHR в процесс формирования количества доминантных фолликулов, а также изучение ассоциации содержания гормонов ФСГ и ЛГ в сыворотке до и после проведения гормональной стимуляции с количеством образующихся ооцитов. В исследовании приняли участие 100 женщин с диагнозом бесплодие, в возрасте от 24 до 42 лет, проходившие процедуру экстракорпорального оплодотворения. С учетом овариального ответа было сформировано 3 группы пациентов: с нормальным овариальным ответом, с гиперстимуляцией, со скудным овариальным ответом. Анализ ДНК на наличие мутации Asn680Ser гена FSHR проводили методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Определение уровней гормонов в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа. В группе с нормальным овариальным ответом гомозиготами было показано следующее распределение частот генотипов: 45,3% - AA, 39,6% - AG, 15,1% - GG. В двух других группах характер распределения частот генотипов соответствовал распределению в группе с нормальным ответом. Статистический анализ уровня гормонов среди пациенток с различным типом овариального ответа показал достоверное повышение базального уровня ФСГ и уровня ФСГ после стимуляции суперооуляции у пациенток со скудным овариальным ответом. Содержание ЛГ в сыворотке после стимуляции достоверно ниже в группе с нормальным овариальным. Базальный уровень АМГ в группе с гиперстимуляцией достоверно выше по сравнению с двумя другими группами.

Ключевые слова: FSHR, ФСГ, рецептор ФСГ, полиморфизм, вспомогательные репродуктивные технологии, бесплодие, фолликулостимулирующий гормон

Abstract. This study was performed to investigate the association between FSH receptor (FSHR) gene polymorphism at position 680 and the number of dominant follicles, also the FSH and LH levels before controlled ovarian hyperstimulation and after it. One hundred patients from 24 to 42 who underwent IVF-ET procedures were included in this study. Three groups were formed: patients with normal ovary response, patients with ovary hyperstimulation and patients with poor ovary response. The FSHR polymorphism was determined by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. The FSHR genotype distribution in patients with normal ovary response was 45,3% for AA, 39,6% for AG and 15,1% for GG. There was no difference among the three genotype groups. The basal levels of FSH and levels after controlled ovarian hyperstimulation were significantly higher in patients with poor ovary response. LH levels after controlled ovarian hyperstimulation were significantly lower in patients

with normal ovary response. The basal levels of AMH were significantly higher in patients with ovary hyperstimulation.

Введение

Распространенность бесплодия среди супружеских пар репродуктивного возраста неуклонно растет, достигая 15% (Серебренникова К.Г., 2010). В связи с этим потребность во вспомогательных репродуктивных технологиях (ВРТ) возрастает, и существует постоянная необходимость в разработке новых наиболее эффективных и безопасных подходов (Сухих Г.Т., 2010). Ожидаемый результат лечения методом ЭКО в значительной степени зависит от эффективности проводимой стимуляции функции яичников. При этом овариальный ответ широко варьирует среди пациенток.

Фолликулогенез рассматривается как постоянный процесс иерархии фолликулов, при котором одновременно происходит рост и созревание одних фолликулов и атрезия других. Отбор фолликулов осуществляется во время ранней фолликулярной фазы на основе дифференциальной чувствительности фолликулов к гонадотропным гормонам, в первую очередь – к ФСГ. Это зависит, в частности, от числа рецепторов гонадотропных гормонов на оболочках фолликулов. Предполагается, что наличие полиморфного варианта гена рецептора фолликулостимулирующего гормона *FSHR 2039 A→G (Asn680Ser)* может привести к уменьшению числа созревающих фолликулов и нарушению оогенеза. В ряде работ показано, что с увеличением числа созревших фолликулов при гормональной стимуляции суперовуляции происходит снижение способности ооцитов к оплодотворению (Сагамонова К.Ю., 2001; Bergere M. et al., 2001). Помимо этого полиморфизм гена *FSHR 2039 A→G (Asn680Ser)* ассоциирован с уровнем гонадотропных гормонов (Sudo S. et al., 2002; Hagen C.P. et al., 2013), а также с овариальным ответом и исследуется с целью оценки реакции рецепторов на стимуляцию препаратами ФСГ (Владимирова И.В., 2015). Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) и его рецептор играют важную роль в развитии фолликул и регулирование стероидогенеза в яичниках, а также широко используется для лечения бесплодия (Richards J.S., 1980; Hsueh A.J.W. et al., 1989; Howles C.M., 2000; McGee E.A., Hsueh A.J.W., 2000).

Целью исследования было изучение вклада полиморфизма гена рецептора фолликулостимулирующего гормона *FSHR* в процесс формирования количества доминантных фолликулов, а также изучение ассоциации содержания гормонов ФСГ и ЛГ в сыворотке до и после проведения гормональной стимуляции с количеством образующихся ооцитов.

Материал и методы исследования

В исследовании приняли участие 100 женщин с диагнозом бесплодие, в возрасте от 24 до 42 лет, проходившие процедуру экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) в «Центре ЭКО и репродукции» в Ростове-на-Дону. Все женщины дали информированное согласие на проведение исследований. Обследуемые женщины были разбиты на группы в соответствии со степенью овариального ответа на гормональную стимуляцию: группа 1 с нормальным овариальным ответом и числом созревших фолликулов от 5 до 15 ($n=53$), группа 2 с гиперстимуляцией яичников и количеством созревших фолликулов от 16 до 47, без переноса эмбрионов в течение минимум двух следующих менструальных циклов ($n=27$), группа 3 со скудным овариальным ответом и количеством созревших фолликулов от 1 до 4 ($n=20$). Все женщины имели нормальный базальный уровень антимюллера гормона (АМГ) и фолликулостимулирующего гормона (ФСГ). Базальный уровень гормонов в сыворотке крови определяли за 5-6 циклов до начала стимуляции яичников, на 2-5-ый день менструального цикла. После стимуляции уровень гормонов в сыворотке крови определяли в день пункции, на 12-16-ый день менструального цикла.

Забор крови был проведен в утренние часы натощак с использованием вакуумного метода. Сыворотку крови получали стандартным методом. До исследования сыворотку крови хранили в морозильной камере при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Определение уровней ФСГ и ЛГ в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем «Гонадотропин ИФА-ФСГ» и «Гонадотропин ИФА-ЛГ» («М-Индекс», Россия) и автоматического иммуноферментного анализатора «Alisei» (Италия).

Для проведения молекулярно-генетических исследований использовалась цельная кровь. ДНК выделяли из лейкоцитов обследуемых с использованием реагента «ДНК-Экспресс-Кровь» (Литех, Россия). Анализ ДНК на наличие мутации *Asn680Ser* [rs6166] гена *FSHR* проводили методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов с помощью эндонуклеазы рестрикции *BsrI* и праймеров: прямой 5'-TTTGTGGTCATCTGTGGCTGC-3' и обратный 5'-CAAAGGCAAGGACTGAATTATCATTT-3' (Sudo S. et al., 2002). Детекцию продуктов амплификации и рестрикции осуществляли методом горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле.

Статистическая обработка результатов проводилась при помощи пакета Excel с применением параметрического t-критерия Стьюдента для проверки равенства средних значений в двух выборках. Ошибка первого рода менее 5 % считалась приемлемой.

Соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга определяли с использованием Hardy-Weinberg equilibrium calculator на сайте <http://oege.org/software/hardy-weinberg.html> (Rodriguez S. et al., 2009). Оценку различий в распределении аллельных вариантов генов в исследуемых группах производили по критерию χ^2 при помощи программы «ГенЭксперт» на сайте http://www.gen-exp.ru/calculator_or.php.

Результаты исследований и их обсуждение

Для определения влияния полиморфизма гена *FSHR* 2039 A→G (*Asn680Ser*) на процесс фолликулогенеза была исследована частота данного полиморфизма. Генотипическая структура популяции по данному полиморфизму у женщин, прошедших процедуру ЭКО, подчинялась равновесию Харди-Вайнберга.

В результате исследования установлено, что в группе с нормальным овариальным ответом гомозиготами по аллели 2039 A гена *FSHR* являлись 45,3% женщин, гетерозиготы 2039 A-G составили 39,6%, гомозиготы по мутантной аллели 2039 G - 15,1% (табл. 1). Характер распределения частот генотипов среди женщин с гиперстимуляцией и со скудным овариальным ответом соответствовал распределению в группе с нормальным ответом. Частота мутантной аллели 2039 G в группе со скудным овариальным ответом оказалась выше по сравнению с таковой в группах с нормальным ответом и с гиперстимуляцией (0,500 против 0,361 и 0,404 соответственно), однако данные отличия статистически не значимы.

Таблица 1 - Частота генотипов и аллелей гена *FSHR* в клетках крови женщин

Генотип	Группа 1 (n=53), абс., (%)	Группа 2 (n=27), абс., (%)	OR (95% CI)	χ^2_1 (P)	Группа 3 (n=20), абс., (%)	OR (95% CI)	χ^2_1 (P)
AA	24 (45,3)	11 (40,8)	0,83 (0,32-2,12)	1,39 (0,50)	6 (30,0)	0,52 (0,17-1,55)	2,51 (0,29)
AG	21 (39,6)	9 (33,3)	0,76 (0,29-2,01)		8 (40,0)	1,02 (0,36-2,90)	
GG	8 (15,1)	7 (25,9)	1,97 (0,63-6,17)		6 (30,0)	2,41 (0,71-8,14)	
Аллель 2039 G	0,349	0,426	1,38 (0,71-2,71)	0,90 (0,34)	0,500	1,86 (0,89-3,90)	2,78 (0,10)
χ^2_2 (P)	Генотипы: 0,58 (0,75)				Аллели: 0,51 (0,48)		
Группа 1 - нормальный овариальный ответ; Группа 2 - гиперстимуляция; Группа 3 - скудный овариальный ответ; χ^2_1 (P) - сравнение частот генотипов и аллелей с Группой 1; χ^2_2 (P) - сравнение между группами 2 и 3							

Анализ данных литературы показал противоречивые результаты. По данным М.Н. Sheikhha и соавт. полиморфизм гена *FSHR* 2039 A→G (*Asn680Ser*) коррелирует с ответом на овариальную стимуляцию (Sheikhha M.H. et al., 2011). В работах И.В. Владимировой и А. Allegra с соавт. показано, что носительство генотипа GG предрасполагает к «гипер» ответу (Владимирова И.В., 2015; Allegra A. et al., 2016). По данным J.K. Jun генотип GG предрасполагает к «бедному» ответу (Jun J.K. et al., 2006). В ходе нашей работы статистической значимой разницы в частоте регистрации аллельного полиморфизма гена *FSHR* между исследуемыми группами женщин обнаружено не было.

Показано, что активность рецептора ФСГ может изменять сывороточный уровень ФСГ (Sudo S., 2002), поэтому при проведении исследования был определен уровень ФСГ у бесплодных женщин, проходящих процедуру ЭКО, до и после проведения гормональной стимуляции яичников. Также был определен базальный уровень лютеинизирующего гормона (ЛГ), антимюллерова гормона (АМГ), прогестерона и эстрадиола (табл. 2).

Таблица 2 - Средний уровень гормонов у бесплодных женщин до и после стимуляции яичников в зависимости от типа овариального ответа

Гормоны	Группа 1 (n=53)	Группа 2 (n=27)	p*	Группа 3 (n=20)	p**	p***
ФСГ, мМЕ/мл	6,35±0,236	5,61±0,345	0,085	8,20±0,543	<0,001	0,004
ФСГ*, мМЕ/мл	6,56±0,363	6,43±0,639	0,867	9,99±0,725	<0,001	<0,001
ЛГ, мМЕ/мл	5,51±0,333	5,85±0,513	0,575	4,67±0,382	0,071	0,106
ЛГ*, мМЕ/мл	1,51±0,194	2,92±0,444	0,006	5,08±1,491	0,178	0,028
АМГ, нг/мл	3,84±0,420	8,31±1,302	0,003	2,52±0,446	<0,001	0,038
Прогестерон, нмоль/л	5,80±1,455	3,89±0,796	0,257	3,81±0,705	0,943	0,227
Эстрадиол, нмоль/л	93,43±14,160	97,13±35,650	0,924	59,14±10,642	0,315	0,059

Примечание: * - уровень гормонов в сыворотке крови после стимуляции, в день пункции, на 12-16-ый день менструального цикла; p* - статистически значимые отличия группы 2 в сравнении с группой 1; p** - статистически значимые отличия группы 3 в сравнении с группой 2; p*** - статистически значимые отличия группы 1 в сравнении с группой 3.

Статистический анализ уровня гормонов среди пациенток с различным типом овариального ответа показал статистически достоверное повышение базального уровня ФСГ и уровня ФСГ после стимуляции суперовуляции у пациенток со скудным овариальным ответом по сравнению с пациентками с нормальным ответом и с гиперстимуляцией ($p < 0,005$).

Базальный уровень ЛГ в группах достоверно не отличается, однако имеется тенденция к снижению базального уровня ЛГ в группе со скудным овариальным ответом относительно группы с гиперстимуляцией ($p = 0,071$). Содержание ЛГ в сыворотке после стимуляции достоверно ниже в группе с нормальным овариальным ответом относительно двух других групп ($p < 0,05$).

Базальный уровень АМГ в группе с гиперстимуляцией достоверно выше по сравнению с двумя другими группами ($p = 0,003$ и $p = 0,038$).

Содержание прогестерона и эстрадиола в сыворотке крови до проведения гормональной стимуляции яичников достоверных отличий в исследуемых группах не имеет, однако имеется тенденция к снижению базального уровня эстрадиола в группе со скудным овариальным ответом относительно группы с нормальным ответом ($p = 0,059$).

Выводы

Сравнение гормонального профиля в группах с различным типом овариального ответа показало достоверно более высокий уровень ФСГ в сыворотке крови пациенток со скудным овариальным ответом до и после стимуляции яичников; достоверно более низкий уровень ЛГ после стимуляции в группе с нормальным овариальным ответом; статистически достоверное повышение уровня АМГ в группе с гиперстимуляцией.

Исследования выполнены на оборудовании ЦКП «Высокие технологии» ЮФУ при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 16-34-01108.

Список литературы

1. Владимирова И.В. Прогнозирование овариального ответа в программах вспомогательных репродуктивных технологий с использованием молекулярно-генетических маркеров: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.01 - акушерство и гинекология. – 2015.
2. Сагамонова К.Ю. Пути оптимизации программы экстракорпорального оплодотворения и переноса эмбриона в полость матки: автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. – 2001.
3. Серебренникова К.Г. Эндометрий у пациенток с бесплодием и методы его коррекции / Серебренникова К.Г. [и др.] // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2010. – №. 5.
4. Сухих Г.Т. Бесплодный брак / Сухих Г.Т., Назаренко Т.А. // Современные подходы к диагностике и лечению. М. – 2010.
5. Allegra A. The carriers of the A/GG/G allelic combination of the c. 2039 A> G and c.-29 G> A FSH receptor polymorphisms retrieve the highest number of oocytes in IVF/ICSI cycles / Allegra A., Marino A., Raimondo S. [et al.] // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2016. – С. 1-11.
6. Altmäe S. Genetic predictors of controlled ovarian hyperstimulation: where do we stand today? / Altmäe S. [et al.] // Human reproduction update. – 2011. – Т. 17. – №. 6. – С. 813-828.
7. Alviggi C. Hormonal, functional and genetic biomarkers in controlled ovarian stimulation: tools for matching patients and protocols / Alviggi C., Humaidan P., Ezcurra D. // Reproductive Biology and Endocrinology. – 2012. – Т. 10. – №. 1. – С. 1.
8. Bergère M. An idiopathic infertility with oocytes metaphase I maturation block: Case report / Bergère M. [et al.] // Human Reproduction. – 2001. – Т. 16, №. 10. – С. 2136-2138.
9. Desai S.S. Mutations and polymorphisms in FSH receptor: functional implications in human reproduction / Desai S.S., Roy B.S., Mahale S.D. // Reproduction. – 2013. – Т. 146. – №. 6. – С. R235-R248.
10. Hagen C.P. et al. FSHB-211 and FSHR 2039 are associated with serum levels of follicle-stimulating hormone and antimüllerian hormone in healthy girls: a longitudinal cohort study / Hagen C.P., Aksglaede L., Sorensen K. [et al.] // Fertility and sterility. – 2013. – Т. 100. – №. 4. – С. 1089-1095.
11. Howles C.M. Role of LH and FSH in ovarian function / Howles C.M. // Molecular and cellular endocrinology. – 2000. – Т. 161. – №. 1. – С. 25-30.
12. Hsueh A.J.W. Granulosa cells as hormone targets: the role of biologically active follicle stimulating hormone in reproduction / Hsueh A.J.W., Bicsak T.A., Jia X.C. [et al.] // Recent Prog. Horm. Res. - 1989. - Vol. 45. - P. 209–277.
13. Jun J.K. Follicle-stimulating hormone receptor gene polymorphism and ovarian responses to controlled ovarian hyperstimulation for IVF-ET / Jun J.K., Yoon J.S., Ku S.Y. [et al.] // Journal of human genetics. – 2006. – Т. 51. – №. 8. – С. 665-670.
14. McGee E.A. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles / McGee E.A., Hsueh A.J.W. // Endocrine reviews. – 2000. – Т. 21. – №. 2. – С. 200-214.

15. Richards J.S. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation / Richards J.S. // *Physiol. Rev.* - 1980 - Vol. 60. - P. 51–89.
16. Rodriguez S. Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies / Rodriguez S., Gaunt T.R., Day I.N.M. // *American Journal of Epidemiology Advance.* - 2009. DOI 10.1093/aje/kwn359.
17. Sheikha M.H. Investigating the association between polymorphism of follicle-stimulating hormone receptor gene and ovarian response in controlled ovarian hyperstimulation / Sheikha M.H., Eftekhar M., Kalantar S.M. [et al.] // *Journal of human reproductive sciences.* – 2011. – Т. 4. – №. 2. – С. 86.
18. Sudo S. Genetic and functional analyses of polymorphisms in the human FSH receptor gene / Sudo S., Kudo M., Wada S. [et al.] // *Molecular Human Reproduction.* - 2002. - Vol. 8, No. 10. - P. 893-899.

Spisok literary

1. Vladimirova I.V. Prognozirovanie ovarial'nogo otveta v programmax vspomogatel'nyx reproductivnyx texnologij s ispol'zovaniem molekulyarno-geneticheskix markerov: avtoref. dis. ... kand. med. nauk: 14.01.01 - akusherstvo i ginekologiya. – 2015.
 2. Sagamonova K.Yu. Puti optimizacii programmy e'kstrakorporal'nogo oplodotvoreniya i perenosa e'mbriona v polost' matki: avtoref. diss. ... d-ra med. nauk. – 2001.
 3. Serebrennikova K.G. E'ndometrij u pacientok s besplodiem i metody ego korrekcii / Serebrennikova K.G. [i dr.] // *Vestnik Rossijskogo universiteta družby narodov. Seriya: Medicina.* – 2010. – №. 5.
 4. Suxix G.T. Besplodnyj brak / Suxix G.T., Nazarenko T.A. // *Sovremennye podxody k diagnostike i lecheniyu.* М. – 2010.
 5. Allegra A. The carriers of the A/GG/G allelic combination of the c. 2039 A> G and c.-29 G> A FSH receptor polymorphisms retrieve the highest number of oocytes in IVF/ICSI cycles / Allegra A., Marino A., Raimondo S. [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* – 2016. – S. 1-11.
 6. Altmäe S. Genetic predictors of controlled ovarian hyperstimulation: where do we stand today? / Altmäe S. [et al.] // *Human reproduction update.* – 2011. – Т. 17. – №. 6. – S. 813-828.
 7. Alviggi C. Hormonal, functional and genetic biomarkers in controlled ovarian stimulation: tools for matching patients and protocols / Alviggi C., Humaidan P., Ezcurra D. // *Reproductive Biology and Endocrinology.* – 2012. – Т. 10. – №. 1. – S. 1.
 8. Bergère M. An idiopathic infertility with oocytes metaphase I maturation block: Case report / Bergère M. [et al.] // *Human Reproduction.* – 2001. – Т. 16, №. 10. – S. 2136-2138.
 9. Desai S.S. Mutations and polymorphisms in FSH receptor: functional implications in human reproduction / Desai S.S., Roy B.S., Mahale S.D. // *Reproduction.* – 2013. – Т. 146. – №. 6. – S. R235-R248.
 10. Hagen C.P. et al. FSHB-211 and FSHR 2039 are associated with serum levels of follicle-stimulating hormone and antimüllerian hormone in healthy girls: a longitudinal study / Hagen C.P., Hagen C.P., Hagen C.P. [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* – 2017. – Т. 26, №. 1. – S. 1-11.
- Лянгасова О.В., Савикина К.Г., Ломтева С.В., Шкурат Т.П., Полиморфные варианты гена FSHR и гормональный профиль при проведении программ вспомогательных репродуктивных технологий // «Живые и биокосные системы». – 2017. – № 19; URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-19/article-6>

- cohort study / Hagen C.P. , Aksglaede L., Sorensen K. [et al.] // *Fertility and sterility*. – 2013. – Т. 100. – №. 4. – S. 1089-1095.
11. Howles C.M. Role of LH and FSH in ovarian function / Howles C.M. // *Molecular and cellular endocrinology*. – 2000. – Т. 161. – №. 1. – S. 25-30.
 12. Hsueh A.J.W. Granulosa cells as hormone targets: the role of biologically active follicle stimulating hormone in reproduction / Hsueh A.J.W., Bicsak T.A., Jia X.C. [et al.] // *Recent Prog. Horm. Res.* - 1989. - Vol. 45. - P. 209–277.
 13. Jun J.K. Follicle-stimulating hormone receptor gene polymorphism and ovarian responses to controlled ovarian hyperstimulation for IVF-ET / Jun J.K., Yoon J.S., Ku S.Y. [et al.] // *Journal of human genetics*. – 2006. – Т. 51. – №. 8. – S. 665-670.
 14. McGee E.A. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles / McGee E.A., Hsueh A.J.W. // *Endocrine reviews*. – 2000. – Т. 21. – №. 2. – S. 200-214.
 15. Richards J.S. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation / Richards J.S. // *Physiol. Rev.* - 1980 - Vol. 60. - P. 51–89.
 16. Rodriguez S. Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies / Rodriguez S., Gaunt T.R., Day I.N.M. // *American Journal of Epidemiology Advance*. - 2009. DOI 10.1093/aje/kwn359.
 17. Sheikhha M.H. Investigating the association between polymorphism of follicle-stimulating hormone receptor gene and ovarian response in controlled ovarian hyperstimulation / Sheikhha M.H., Eftekhari M., Kalantar S.M. [et al.] // *Journal of human reproductive sciences*. – 2011. – Т. 4. – №. 2. – S. 86.
 18. Sudo S. Genetic and functional analyses of polymorphisms in the human FSH receptor gene / Sudo S., Kudo M., Wada S. [et al.] // *Molecular Human Reproduction*. - 2002. - Vol. 8, No. 10. - P. 893-899.