

© Мачарадзе Д.Ш., 2003

Д.Ш. Мачарадзе

БРОНХИАЛЬНАЯ АСТМА И ИНФИЦИРОВАНИЕ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* У ДЕТЕЙ

Детская городская поликлиника № 102, Москва

Изучали особенности Т-клеточного иммунитета (субпопуляции лимфоцитов) и уровень ИЛ2 в крови у детей с бронхиальной астмой (БА), инфицированных микобактериями туберкулеза, по сравнению со здоровыми детьми и позитивной/негативной реакцией Манту (>5мм). Уровень CD3- и CD4-лимфоцитов крови не изменялся в сравниваемых группах, содержание CD8 и CD16 имело тенденцию к повышению у туберкулинопозитивных лиц; CD95, напротив, снижалось у инфицированных детей, особенно имеющих гиперергическую реакцию. Уровень CD45RA имел тенденцию к снижению, а концентрация ИЛ2 в крови повышалась у инфицированных микобактериями детей с БА и здоровых лиц. Инфекция *M. tuberculosis*, возможно, способна влиять на Th1/Th2-баланс у детей с БА, хотя статистически достоверного подтверждения мы не получили.

Lymphocyte subpopulations and IL-2 level in blood of asthmatic children and healthy donors with negative/positive Mantoux reaction (MR >5 mm) were studied. CD3 and CD4 level were not changed, CD8 and CD16 tended to increase in tuberculin sensitized persons. CD95 level was decreased in infected children, especially in children with hyperergic MR (~2-fold). CD45RA level tended to decrease, while IL-2 level was elevated in infected healthy persons and asthmatic children. Infection *Mycobacterium tuberculosis* can influence on Th1/Th2 balance through Th1-cells but its unlikely to decrease allergic sensitization in asthmatic children with positive MR.

Хотя не ясно, какие именно факторы оказывают решающее влияние на дифференцировку CD4-клеток, считается, что Th2-клон лимфоцитов селективно активируется при аллергических и паразитарных заболеваниях, а Th1 — чаще при бактериальных и вирусных инфекциях [1—4].

Участие Th2-лимфоцитов в патогенезе бронхиальной астмы (БА) доказано обнаружением мРНК ИЛ3, ИЛ4, ИЛ5 и ГМ-КСФ (но не γ ИФН) в клетках бронхоальвеолярной лаважной жидкости и бронхиальном биоптате у больных с atopической формой заболевания [2—10].

Считается, что при другой частой патологии человека — туберкулезе — защитная реакция от *Mycobacterium tuberculosis* опосредуется Th1-реакцией [3, 12—14]. Th1-профиль цитокинов более характерен для тубинфицированных лиц, тогда как у больных активным туберкулезом чаще выявляют повышенное содержание ИЛ4 и снижение уровня γ ИФН в крови, что ассоциируется с прогрессированием тяжести течения заболевания и иммуносупрессией организма [3, 12, 15].

В педиатрической практике, особенно последних лет, нередко случаи выявления у детей нарастания сенсибилизации к туберкулину, которую оценивают по данным реакции Манту (РМ). Туберкулиновая проба — модель типичной реакции гиперчувствительности замедленного типа, сугубо иммунологический феномен, так как его результат может быть

положительным только в сенсибилизированном организме [16].

Ранее исследователями было замечено, что введение вакцины BCG в неонатальном периоде позволяет частично предотвратить развитие лейкемии и рака у детей, но только в том случае, когда вакцинация предохраняла ребенка от развития самого туберкулеза [15]. Есть предположение о том, что величина папулы BCG у детей первого года жизни и развитие у них в более позднем возрасте БА находятся в прямой зависимости друг от друга [14]. Однако, по последним данным, подобное превентивное действие инфекции *M. tuberculosis* подвергается сомнению [17].

Целью нашего исследования было изучение состояния Т-клеточного иммунитета и содержания ИЛ2 в периферической крови у детей с БА, инфицированных микобактериями по сравнению с туберкулиноотрицательными больными БА и здоровыми лицами. Кроме того, нами ретроспективно проанализированы данные о распространенности туберкулинопозитивности у школьников за периоды 1994—1997 гг. и 1999—2001 гг.

Материалы и методы исследования

Обследованием за период 1994—1997 гг. были охвачены 2520 школьников 1-го класса в возрасте 6—7 лет и 2007 старшеклассников 13—14 лет, посещавших 10 школ Северо-Восточного админис-

тративного округа Москвы. В тех же школах за период 1999—2001 гг. обследованы 1680 ребенка 1-го класса и 1729 школьников 8-го класса.

Туберкулиновую пробу с 2 ТЕ ставили опытные медсестры в апреле—мае ежегодно. Учет РМ производили через 72 ч после внутрикожного введения туберкулина; слабо положительным результатом считали наличие индурата диаметром 5—9 мм. Считается, что появление положительной РМ после повторных отрицательных и сомнительных результатов проб (при диаметре папулы менее 5 мм) может свидетельствовать об инфицировании ребенка *M. tuberculosis* [18]. Появление резко положительной РМ после слабо положительной, перемежающихся с отрицательной, также характерно для больных, инфицированных микобактериями [18].

В исследование были включены 75 детей с БА, имеющих в анамнезе туберкулинопозитивность в течение последних 2—3 лет, а также высокую степень сенсибилизации к аллергенам домашней пыли (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*) и/или пыльцы деревьев и трав (диаметр папулы более ++). Ранее специфическая иммунотерапия таким больным не проводилась. На протяжении последних 2 месяцев все пациенты имели стабильное течение БА (ОФВ₁ > 80% от должного).

12 здоровых детей составили 1-ю (контрольную) группу, 3 из них имели негативную РМ, 9 — положительную. Во 2-ю группу вошли 15 больных БА, имеющих тубинфицирование, из которых у 7 отмечалась туберкулиновая гиперергия (диаметр индурата более 17 мм), с негативной РМ было 11 детей с БА.

У всех лиц наличие активного туберкулеза или латентное течение заболевания было исключено с учетом клинического симптомокомплекса воспалительной интоксикации, бронхолегочных симптомов, данных рентгенографии грудной клетки, консультации фтизиатра. Лишь в одном случае зафиксирован семейный контакт ребенка с БА и взрослого, больного туберкулезом.

Никто из инфицированных микобактериями детей в течение последнего года не получал превентивную химиотерапию противотуберкулезными препаратами.

У больных БА перед забором крови все лекарственные средства отменяли за 10—12 ч.

Т-клеточную субпопуляцию лимфоцитов крови анализировали стандартным методом двойной иммунофлуоресценции на проточном цитофлюориметре (Becton Dickinson), рекомендованным Центром онкологии Москвы. Моноклональные антитела против CD3 (Т-клетки), CD4 (Т-хелперы), CD8 (супрессор/цитотоксические Т-клетки), CD16, CD45Ai («наивные» Т-клетки), CD95 (Fas+ лимфоидный элемент) были получены в лаборатории онкоцентра (серия

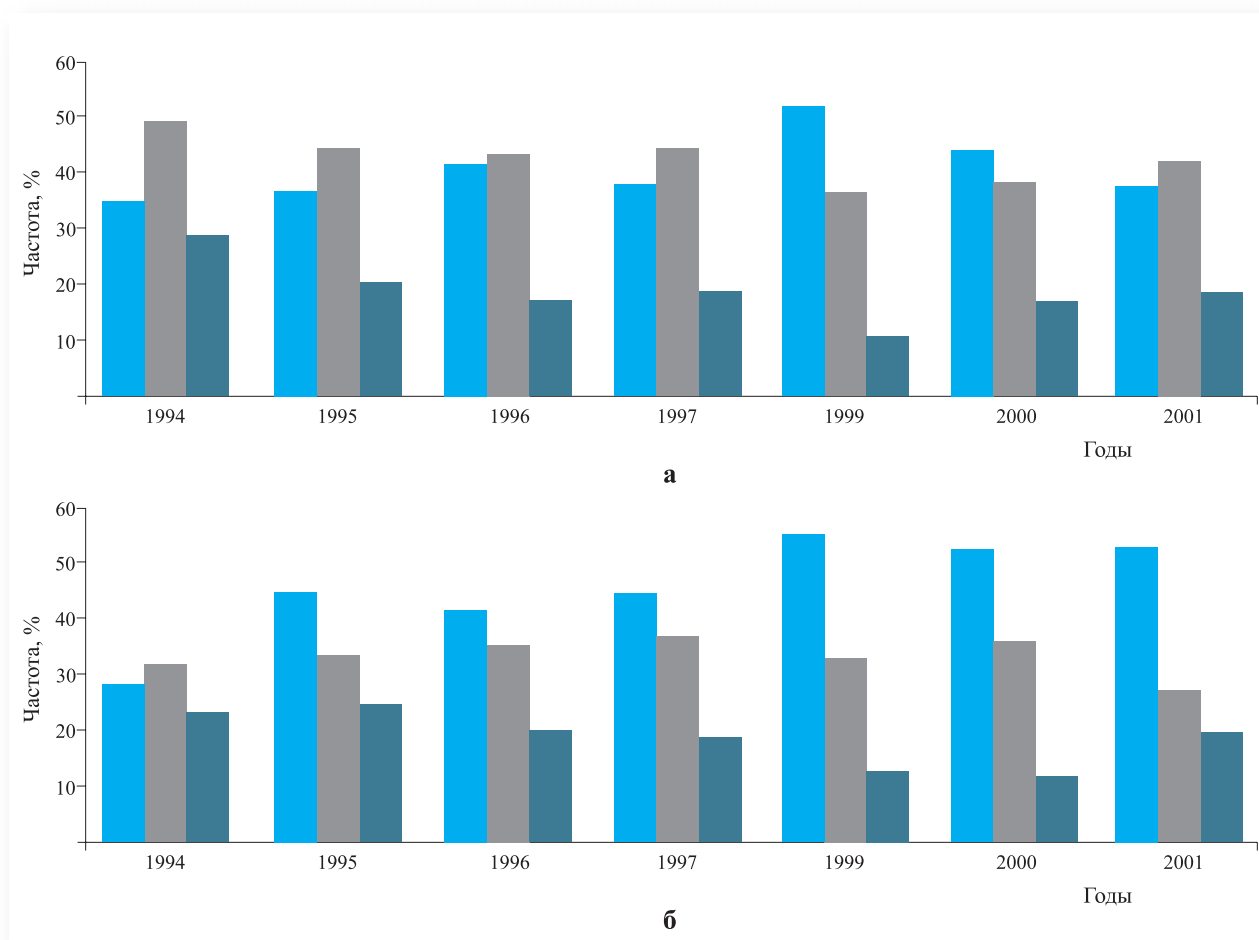


Рис. 1. Динамика результатов оценки реакции Манту у младших (а) и старших (б) школьников в 1994—2001 гг. 1-й столбик — РМ положительная, 2-й столбик — РМ отрицательная, 3-й столбик — РМ сомнительная.

ИСО, производство «Биоцентр», Москва). После выделения лимфоцитов на фиколле клетки отмывали, центрифугировали, добавляли 50 мкл тестируемого моноклонального антитела, инкубировали в течение 30 мин, затем добавляли раствор Хенкса. После повторного центрифугирования клетки инкубировали в присутствии 50 мкл F(ab₂) 2-фрагмента овечьих антител к IgM мыши, меченых ФИТЦ. Цитофлюорометрический анализ лимфоцитарной фракции проводили с использованием цитофлюорографии.

Определение уровня ИЛ2 в ЭДТА-плазме проводили с помощью стандартного иммуоферментного анализа с использованием высокоспецифичного кита (Immunotech, Франция).

Результаты экспрессировали как среднее ($M \pm m$) стандартное отклонение. Различие между процентами популярий лимфоцитов анализировали с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты

Ретроспективный анализ выявил тенденцию к росту численности тубинфицированности среди обследованных школьников, особенно в группе старшеклассников (рис. 1). Так, в 1994 г. у 18% из них диагностирована тубинфицированность, в 1997 г. — у 43%, а в 2001 г. — их число превысило 53%. Более стабильные показатели характеризовали школьников, посещавших 1-й класс (6—7 лет), однако и в этой группе ежегодно врачи выявляли тубинфицирование примерно у 30—37% детей.

При обследовании 75 детей, больных БА и имевших по данным анамнеза и аллергологического обследования высокую степень атопии, большинство также было тубинфицировано (около 63%) (см. таблицу).

Исследование субпопуляций лимфоцитов периферической крови не выявило статистически достоверного изменения уровня CD3 и CD4-лимфоцитов детей 1-й и 2-й групп (рис. 2). У сенсibilизированных к туберкулину больных БА содержание CD8 имело тенденцию к повышению по сравнению с пациентами, имевшими негативную РМ (34,7±6,5% и 26,9±2,6% соответственно, $p > 0,05$). Аналогичная тенденция характеризовала субпопуляцию CD16-

лимфоцитов (23,2±6,1% и 14,3±2,6% соответственно, $p > 0,05$).

CD4-клетки, как известно, экспрессируют Fas (CD95) и Fas ligand (CD95L), которые могут подвергаться апоптозу [19]. Как известно, периферические клетки крови больных БА не экспрессируют CD95L, однако у тубинфицированных детей с БА уровень Fas антигена в крови был снижен примерно в 2 раза, особенно выражено в случае туберкулиновой гиперергии (рис. 2). У детей с БА практически безучастными в процессе тубинфицирования оставались CD45A-клетки — поверхностные маркеры «наивных» Т-клеток, т.е. клеток, ранее не контактировавших с антигеном (здоровые лица с негативной реакцией Манту имели 51±1,7% таких клеток, пациенты с БА — 51±7,9%, $p > 0,05$).

Содержание ИЛ2 в крови исследовали у инфицированных микобактериями здоровых детей и больных БА. Хотя средний уровень ИЛ2 был примерно в 2 раза выше у детей, страдающих БА, по сравнению с контрольной группой, но он между группами не различался.

Обсуждение

Мы предположили, что такой внешнесредовой фактор, как инфицирование *M. tuberculosis*, может оказать определенное влияние на патогенез БА.

Гипотеза превалирования активации Th2-типа лимфоцитов у больных БА подтверждена довольно многими исследованиями [6, 8, 9, 11]. Иммунный ответ при туберкулезе также связан с активацией Т-лимфоцитов и альвеолярных макрофагов [3, 20]. Первыми микобактерии фагоцитируются макрофагами, эффекторные функции которых стимулируются Т-клетками посредством секреции различных цитокинов (в основном γ ИФН).

CD4-лимфоциты продуцируют ИЛ2 и γ ИФН, что доказано обнаружением экспрессии мРНК в биоптате кожи здоровых лиц, которым была проведена РМ [16]. При постановке кожных проб с аллергенами кожная реакция, напротив, ассоциируется с активацией цитокинов Th2-клона лимфоцитов (ИЛ4, ИЛ5, ИЛ6) [7].

Показано повышение экспрессии мРНК ИЛ2 в клетках бронхоальвеолярного смыва и бронхиальном биоптате после провокации аллергеном у больных со стабильной персистирующей БА в отличие от здоровых лиц [9]. По данным S. Nimmagadda и соавт., в случае инкубации мононуклеарных клеток крови с пылью или аллергеном шерсти кошки снижение глюкокортикоидсвязывающей аффинности клеток было вызвано усилением продукции ими ИЛ2, ИЛ4 [21]. Как и некоторые другие медиаторы воспаления (γ ИФН, ИЛ6), ИЛ2 участвует в ингибции апоптоза и продлении жизни нейтрофилов *in vivo* [19].

Более высокий уровень ИЛ2 в крови у детей с БА, имевших тубинфицирование, может подразумевать активацию Th-фенотипа лимфоцитов и

Таблица

Частота выявления позитивной РМ у детей с БА, имевших высокую степень атопии

Показатели	Негативная РМ	Позитивная РМ
n	28	47
Частота, %	37,3	62,7
Частота положительных кожных проб, %:		
домашняя пыль (++)	57	65,3
домашняя пыль (+++)	28,6	25
пыльца (++)	14,3	9,7

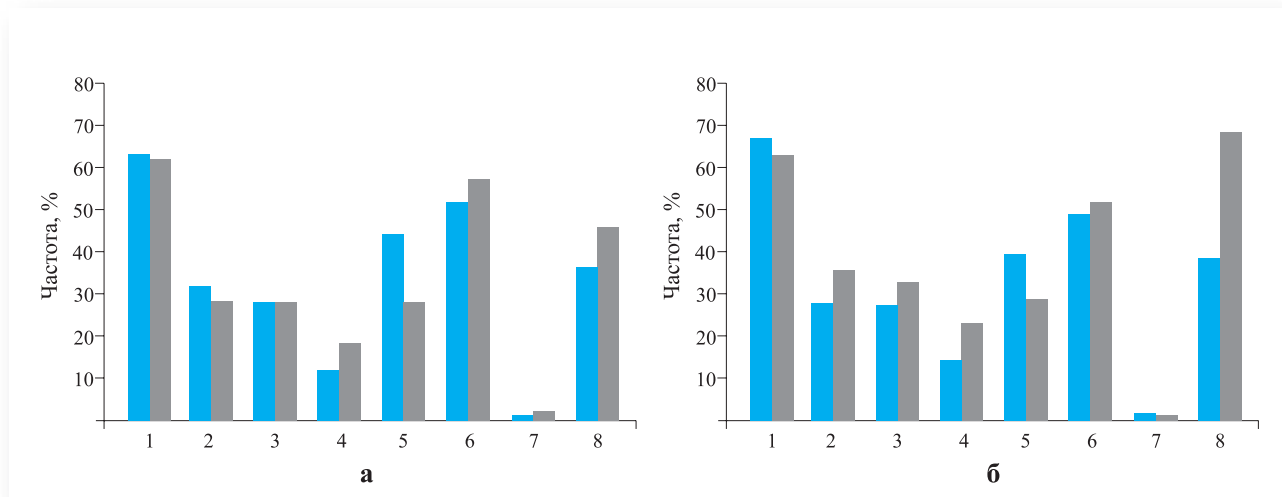


Рис. 2. Содержание различных субпопуляций лимфоцитов и ИЛ2 в крови у здоровых (а) и больных БА (б) детей с негативной и позитивной РМ.
1 — CD3, 2 — CD4, 3 — CD8, 4 — CD16, 5 — CD95, 6 — CD4RA, 7 — CD4/CD8, 8 — ИЛ2, 1-й столбик — РМ негативная, 2-й столбик — РМ позитивная.

возможное его влияние на баланс Th1/Th2-клеток в легких, хотя в этом процессе, возможно, более важную роль играет γ ИФН или ИЛ12 [3, 20, 22].

У больных туберкулезом активацию Th-клона лимфоцитов ассоциируют с протективным иммунитетом [20]. V. Sanchez и соавт. выявили в периферической крови больных активным туберкулезом снижение уровня γ ИФН и повышение ИЛ4 в отличие от здоровых лиц, имевших туберкулинопозитивность, которых характеризовали изменения Th2-типа [13]. Как показано в исследовании J. McDyer и соавт., мононуклеарные клетки больных с лекарственно-резистентным туберкулезом, стимулированные *M. tuberculosis*, пролиферировали меньше ИЛ2 и γ ИФН, чем клетки здоровых, но туберкулинопозитивных лиц [23].

Хотя наибольшую роль при БА и туберкулезе отводят CD4-лимфоцитам, CD8-клетки также могут включаться в аллергическое воспаление и секретировать цитокины Th2-профиля [20, 22]. При туберкулезе эта субпопуляция лимфоцитов способна прямо цитотоксически действовать на клетки-мишени, а также влиять на лизис инфицированных микобактериями клеток и индуцировать их апоптоз [13, 21]. Повышение уровня CD8-клеток в бронхоальвеолярной лаважной жидкости характерна для больных туберкулезом [20], хотя такой же иммунный ответ имеет место и при тяжелом обострении БА [9, 21].

Запрограммированную клеточную смерть идентифицируют экспрессией CD95-клеток. CD4-клетки способны экспрессировать Fas-лиганд и подвергаться апоптозу, тогда как Th2-клетки более резистентны к апоптозу.

По мнению Xin-le Cui, если больных БА сенсibilизировать BCG, а затем PPD в минимальных концентрациях, то можно индуцировать развитие

в дыхательных путях Th1-иммунного ответа со значительной супрессией Th2-типа [1]. В экспериментальном исследовании показано тормозящее влияние иммунизации BCG на продукцию IgE у мышей, сенсibilизированных овалбумином [24].

Направленность этих двух профилей Т-иммунитета регулируется сложными, еще не до конца ясными механизмами. При туберкулезе такой процесс может быть обусловлен, в частности, вирулентностью микобактерий, действие которых еще более полиморфно из-за влияния социальных и экологических факторов на организм больного. Восприимчивость к туберкулезной инфекции ассоциируют также с носительством определенных антигенов HLA-системы.

Как известно, инфицирование микобактериями может протекать в виде латентной инфекции, которая проявляется у больных наличием позитивной РМ, или же стать причиной развития первичного активного туберкулеза легких. В мире на сегодня около 30% населения или около 1,5 млрд. человек тубинфицировано. BCG-вакцинация в неонатальном и детском возрасте эффективно защищает от развития туберкулеза примерно у 50% привитых лиц [20].

Позитивный результат РМ может служить подтверждением диагноза туберкулеза, однако он не является ни чувствительным, ни специфичным тестом [25]. Из общей популяции детей, имеющих индурат 5—9 мм, лишь в 5% случаев был диагностирован туберкулез [25]. В то же время тест может быть отрицательным у 10—51% больных с активным туберкулезом [2, 26].

По данным G. Comstock и соавт., у 1,7% детей с гиперергией на туберкулин в последующем развивается туберкулез [27]. Villabi J. и соавт. при

изучении распространенности тубинфицирования среди 12 000 первоклассников Барселоны лишь в 0,87% случаев выявили позитивную РМ, из которых у 77% детей было диагностировано тубинфицирование без клинических проявлений и только у 6 детей — ранее не выявленный туберкулез [4]. Проведение превентивной химиотерапии тубинфицированным детям и подросткам способствует значительному снижению туберкулинопозитивности среди них [28].

С иммунологической точки зрения, частые респираторные вирусные инфекции в раннем детстве индуцируют повышение продукции ИЛ12 и γ ИФН, что может привести к супрессии Th2-ответа и снижению аллергической сенсибилизации организма [1, 2, 6]. Сегодня одним из механизмов *intrinsic*-астмы, как известно, рассматривается персистенция вирусов (респираторно-синцитиальный вирус? аденовирус?), способных индуцировать Th2-подобный ответ у чувствительных лиц. Таким же индуктором, по мнению S. Holgate, могут выступить и микобактерии [6]. Т. Shirakawa и соавт. высказали предположение о том, что инфекция *M. tuberculosis* может предотвратить развитие БА и других аллергических заболеваний за счет up-регуляции функции Th1-клеток [14]. В недавней работе других японских ученых такая точка зрения подвергнута сомнению на основании изучения баланса Th1/Th2-клеток у больных активным туберкулезом, у которых содержание γ ИФН и ИЛ4-позитивных клеток периферической крови было значительно снижено, а уровень общего IgE повышен [17]. Анти-туберкулезная терапия, проведенная в течение 2—3 ме-

сяцев, не подавляла активность Th1-клеток у таких больных, следовательно, инфекция *M. tuberculosis*, по мнению авторов, не предотвращает организм от развития аллергических заболеваний. Напротив, при ретроспективном анализе на протяжении 30 лет взаимосвязи этих двух нозологий среди женщин, имеющих в детстве инфицирование *M. tuberculosis* или страдающих туберкулезом, достоверно реже встречались случаи аллергических заболеваний и БА [5].

P. Shirtcliffe и соавт. при сопоставлении эпидемиологических данных БА (программа ISAAC) и туберкулеза (программа ВОЗ) среди детей в возрасте 6—7 лет выявили обратную взаимосвязь между этими двумя нозологиями: подобная параллель в группе старшекласников (13—14 лет) была характерна только для детей, уже имевших диагностированную БА [29].

Недавнее эпидемиологическое исследование (более 60 254 детей) подтвердило сосуществование друг с другом заболеваний, протекающих по Th1-или Th2-типу, например, БА и инсулинозависимого диабета или ревматоидного артрита [30].

Инфицирование *M. tuberculosis* является примером внешнего фактора, несомненно, способного влиять на сложное взаимодействие клеток и клеточных элементов у больных БА. Однако наше исследование не выявило статистически достоверных различий иммунологических показателей между группой детей, страдающих БА и инфицированных микобактериями, по сравнению с детьми без атопии.

В нашу задачу не входило изучение факторов риска, способствующих тубинфицированию детей.

ЛИТЕРАТУРА

См. online-версию журнала <http://www.pediatrjournal.ru> № 4/2005, приложение № 2.

© Коллектив авторов, 2004

А.И. Рывкин, Е.Н. Андрианова, О.В. Долгова, Н.С. Побединская,
Т.Г. Решетова, О.В. Кузнецова, Т.Г. Глазова

ПОЧЕЧНАЯ ГЕМОДИНАМИКА ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ У ДЕТЕЙ

Ивановская государственная медицинская академия МЗ РФ, г. Иваново, РФ

Исследовано состояние почечного кровотока во взаимосвязи с показателями легочной вентиляции и кислотно-основного состояния в различные периоды бронхиальной астмы (БА) в зависимости от степени тяжести заболевания. Обострение БА характеризовалось снижением объемного пульсового кровенаполнения почек, гипертензией артериоло-веноулярного звена гемодинамики, что в итоге приводило к несоответствию притока и оттока крови и увеличению времени трансрентальной гемодинамики. Пролонгированная респираторная дисфункция у пациентов с тяжелой БА сочеталась со стойкими нарушениями почечного кровотока. Параметры ренальной гемодинамики имели отчетливую взаимосвязь с показателями азотистого баланса и скоростью гломерулярной фильтрации. Дезадаптивные сосудистые реакции, которые ведут к снижению эффективности

Мачарадзе Д.Ш.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cui Xin-le, Lhu J., Quo L. et al. // *Eur. Resp. J.* — 1997. — Vol. 10. — Suppl. — 475S.
2. Heyns L., Gie R., Kline S. et al. // *Pediatr. Infect. Dis. J.* — 1998. — Vol. 17. — P. 403—407.
3. Robinson D., Ying S., Taylor I. et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 1994. — Vol. 140. — P. 989—993.
4. Villalbi J., Cayla J., Iglesias B. et al. // *Tubercle Lung Dis.* — 1994. — Vol. 75. — P. 105—109.
5. Von Herizen L., Klaukka T., Mattila H., Haathela H. // *J. Allergy Clinical Immunol.* — 1999. — Vol. 104. — P. 1211—1214.
6. Holsate S., Dahlen S. // *Curr. Issues in Respir. Med.* — 1997. — Vol. 1. — P. 5—8.
7. Kay A., Yine S., Varney V. et al. // *Am. J. Crit. Care Med.* — 1991. — Vol. 173. — P. 775—778.
8. Krug N., Wulf K., Erpenbeck V. et al. // *Eur. Resp. J.* — 1997. — Vol. 10. — Suppl. — 445S.
9. Virchow J-Chr., Walker Ch., Hafner D. et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 1995. — Vol. 151. — P. 960—968.
10. Von Mutius E. // *Rev. Fr. Allergol. et Immunol Clin.* — 1999. — Vol. 39, №8. — P. 649—652.
11. Romagnani S. // *Chemical Immunol.* — 1998. — Vol. 71. — P. 178—191.
12. Condos R., Rom W., Liu Y., Schluger N. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 1998. — Vol. 157. — P. 729—735.
13. Sanchez F., Rodriguez J., Agudelo G., Garcia L. // *Inf. Immunol.* — 1994. — Vol. 62. — P. 5673—5678.
14. Shirakawa T., Enomoto T., Shimazu S., Hopkin J.M. // *Science.* — 1997. — Vol. 275. P. 77—79.
15. Grange J., Stanford J., Graham A. et al. // *Lancet.* — 1995. — Vol. 345. — P. 1350—1352.
16. Tsicopoulos A., Hamid Q., Varney V. et al. // *J. Immunol.* — 1992. Vol. 148. P. 2058—2061.
17. Suzuki N., Kudo K., Sano Y., Ito K. // *Int. Arch. Allergy Immunol.* — 2001. — Vol. 124. — P. 113—116.
18. Рачинский С.В. // *Детский доктор.* — 2000. — № 2. — С. 18—24.
19. Pericle F., Liu H., Diaz J. et al. // *Eur. J. Immunol.* — 1994. — Vol. 24. — P. 440—444.
20. Schluger N., Rom W. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 1998. — Vol. 157. P. 679—691.
21. Nimmaganda S., Szeffler S., Spahn J. et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 1997. — Vol. 155. — P. 87—93.
22. Denburg J. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 1996. — Vol. 153. — S11—S12.
23. McDyer J., Hackley M., Walsh T. et al. // *J. Immunol.* — 1997. — Vol. 158. — P. 492—500.
24. Bakir M., Tukenmez F., Barceciler N. et al. // *J. Asthma.* — 2000. — Vol. 37. — P. 329—334.
25. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2000. Vol. 161. P. 1376—1395.
26. Andersen P., Munk M., Pollock J., Doherty T. // *Lancet.* — 2000. — Vol.356. — P. 1099—1104.
27. Comstock G., Livesay V., Woolpen S. // *Am. J. Epidemiol.* — 1999. — Vol. 99. — P. 431—438.
28. Regan M., Togue K., Bellis M. et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 1995. — Vol. 50. — Suppl. 2. — A60.
29. Shirtcliffe R., Weatherall M., Beasley R. // *Respirology.* — 2002. Vol. 7, № 2. P. 153—155.
30. Kero J., Gissler M., Hemminki E., Isolauri E. // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2001. — Vol. 108. — P. 781—783.