

Ciąże bliźniacze koni – uwarunkowania genetyczne i reperkusje hodowlane

Sebastian Mucha, Laura Wachowska,
Tomasz Szwaczkowski

AR w Poznaniu

Konie, szczególnie rasy pełnej krwi angielskiej, charakteryzują się niską płodnością. Okólski [19] podaje, że każdego roku tylko około 50% zażrebionych klaczy pełnej krwi rodzi zdrowe potomstwo. Nieco wyższe wskaźniki notowane są w Wielkiej Brytanii i Irlandii. Zgodnie z danymi znajdującymi się w Księdze Stadnej Weatherby's, roczna średnia wyżrebień wynosi tam około 67%. Mimo znacznego rozwoju medycyny weterynaryjnej w XX wieku nastąpiła jedynie nieznaczna poprawa wyników reprodukcyjnych [16]. Niska płodność nie pozostaje bez wpływu na opłacalność hodowli, a w przypadku koni pełnej krwi angielskiej jest ona niższa niż u innych ras. Sytuację tę pogarszają jeszcze straty wynikające z komplikacji związanych z ciążami bliźniaczymi. Z badań przeprowadzonych przez Pawlak i wsp. [21] wynika, że w populacji koni pełnej krwi notuje się ok. 4,5% ciąż bliźniaczych. Wraz ze zmniejszeniem się udziału genów tej rasy udział ciąż mnogich sukcesywnie maleje (w przypadku klaczy o udziale genów rasy pełnej krwi angielskiej 75-99% – ciążę mnogie stanowiły 3,2%, u klaczy z udziałem 1-24% genów tej rasy – 1,9%).

Ciąże mnogie u klaczy są niepożądane, gdyż pociągają za sobą wiele komplikacji i negatywnych konsekwencji. Ważna jest zatem znajomość czynników środowiskowych i genetycznych determinujących ciążę mnogą, dzięki którym możliwa jest diagnostyka.

Jak już wspomniano, odnotowane różnice w występowaniu ciąż mnogich w zależności od udziału genów rasy pełnej krwi angielskiej wskazują na genetyczne uwarunkowanie tej cechy. Warto w tym miejscu przytoczyć także wyniki innych badań potwierdzających tę tezę. Dotyczą one wprawdzie częstości występowania mnogich owulacji, nie mając bezpośredniego przełożenia na częstość ciąż bliźniaczych, to jednak, jak wykazano w badaniach Karlsena i wsp. [13] przeprowadzonych na bydło, korelacja genetyczna między tymi cechami jest bardzo wysoka, wynosi bowiem ponad 0,9. Z dostępnej literatury wynika, że częstość występowania mnogich owulacji u koni kształtuje się na różnych poziomach: od stosunkowo niskich wartości – 17,0% [19], poprzez nieco wyższe oszacowania dokonane przez Daviesa Morela i O'Sullivan [8] – 22,4% oraz Newcombea [18] – 33,7%, aż do najwyższych współczynników uzyskanych przez Górecką [9] – 50%. Oprócz podwójnych owulacji zdarzają się również potrójne, które wg Okólskiego [19] stanowią 1,2-2,0% wszystkich owulacji; autor ten odnotował też jeden przypadek poczwórnej owulacji (0,2%).

W populacji koni pełnej krwi angielskiej częstość występowania mnogich owulacji waha się w granicach od 2,5 do 15,9% [3, 14, 18, 21]. Bez względu na notowane w literaturze różnice, bezspornym pozostaje fakt, że zdecydowanie najwyższe wartości tego współczynnika występują w populacji koni pełnej krwi angielskiej. Kulisa i wsp. [14] podają, że 9,2% klaczy, zarejestrowanych w IX tomie Polskiej Księgi Stadnej Koni Pełnej Krwi Angielskiej, przebyło ciążę bliźniaczą. U koni ras prymitywnych, w przeciwieństwie do koni pełnej krwi, ciążę mnogie są bardzo rzadkie. Zanotowano jeden taki przypadek na 279 klaczy konika polskiego, utrzymywanych w Popielnie [21].

Omawiając zjawisko ciąż mnogich u zwierząt, warto przytoczyć badania prowadzone w odniesieniu do człowieka. Według Bulmera [5] w populacji ludzkiej około 30-40% ciąż bliźniaczych jest jednojajowych, a 60-70% – dwujajowych. Odsetek bliźniąt jednojajowych jest względnie stały w różnych populacjach, wynosząc 3,5 na 1000 żywych urodzeń. Leszczyńska-Gorzela i wsp. [15] wskazują, że czynnikami w znacznym stopniu determinującymi występowanie ciąż mnogich są: stan odżywienia matki, pora roku (w której nastąpiło zapłodnienie), liczba ciąż oraz wiek (im później kobieta zachodzi po raz pierwszy w ciążę, tym większe prawdopodobieństwo wystąpienia ciąży mnogiej). Należy podkreślić, że u ludzi ciążę mnogie spowodowane są także w dużej mierze skutkami leczenia niepłodności, tj. lekami indukującymi owulację, oraz stosowaniem technik wspomaganego rozrodu (np. zapłodnienie *in vitro*). Generalnie liczba takich ciąż mnogich na przestrzeni ostatnich lat wzrasta. Znamiennym jest fakt, że w latach 1975-1985 największy wzrost ciąż bliźniaczych zaobserwowano w Izraelu (2,78%) i w Szwecji (1,81%), ponieważ po raz pierwszy w tych krajach (w połowie lat siedemdziesiątych) zastosowano hormonalne leki indukujące owulację. Ciążę mnogie mogą być determinowane także czynnikami genetycznymi (przynależnością do rasy i plemienia).

Przytoczone wyżej informacje dotyczące człowieka, mogą stanowić cenną inspirację w analizie czynników warunkujących ciążę bliźniaczą u koni. Należy zaznaczyć, że ciążę mnogie są niepożądane także u bydła, zakres prowadzonych dotychczas badań w przypadku tych zwierząt jest o wiele szerszy niż u koni, co uzasadnia odwoływanie się do pewnych analogii.

Czynniki środowiskowe determinujące ciążę bliźniaczą

Jednym z najbardziej znaczących czynników środowiskowych jest pora roku. Do wniosków takich skłaniają badania Okólskiego [19], w których wykazano u koni najniższą częstość owulacji mnogich w kwietniu (11,1%), a najwyższą w październiku (22,2%). Z tymi spostrzeżeniami korespondują wyniki badań w odniesieniu do bydła [13]. Częstość występowania mnogich porodów u bydła jest największa w czerwcu i lipcu. Przypuszcza się, że jest to wynik jesiennego spadku temperatury, który z kolei wywołuje wzrost częstości poliowulacji; jako przyczynę wskazuje się też lepsze żywienie tych zwierząt w okresie jesiennym. Zaobserwowano również drugi – jesienny szczyt częstości występowania mnogich porodów u bydła, co wynika prawdopodobnie z sezonowej zmiany stosunku długości dnia i nocy. Intensywność wpływu pory roku na częstość występowania ciąż mnogich zależy w dużej mierze od szerokości geograficznej i jest bardziej zauważalna w rejonach, gdzie występują znaczne różnice temperatury i nasłonecznienia [13].

Istotnym czynnikiem, mającym wpływ na występowanie ciąży mnogich, jest wiek klaczy. Davies Morel i O'Sullivan [8] wykazali postępujący wzrost poliowulacji wraz z wiekiem – od 15,0% u klaczy 3-5-letnich aż do 35,1% u klaczy 18-22-letnich. Górecka [9] podaje, że najwyższy odsetek owulacji mnogich (63,3%) występuje u klaczy w wieku 6-10 lat. Z kolei we wcześniejszych badaniach, prowadzonych przez Okólskiego [19] na jajnikach 1163 klaczy pochodzących z uboju, stwierdzono, że najczęściej owulacje mnogie występują u klaczy starszych w wieku powyżej 10 lat (10-20 lat). Ustalono ponadto, że klacze, które nie miały ciąży mnogiej były dłużej użytkowane rozplodowo, a klacze, które częściej rodziły bliźnięta eliminowano ze stada, ponieważ istniała obawa powtórzenia się ciąży mnogiej.

Uwarunkowania genetyczne

Mocnym argumentem, przemawiającym na rzecz tezy o genetycznym uwarunkowaniu ciąży bliźniaczych u koni, są wspomniane różnice między rasami, czy związane z udziałem genów rasy pełnej krwi angielskiej. Jednak z drugiej strony badania, nieliczne do tej pory, przeprowadzone nad oceną współczynnika odziedziczalności plenności koni, świadczą o niewielkim uwarunkowaniu genetycznym. Bresińska i wsp. [2] oszacowali współczynnik h^2 dla polskiej populacji koni pełnej krwi angielskiej na poziomie 0,038. Oszacowań tych dokonano na podstawie modelu liniowego zwierzęcia dla plenności, wyrażonej jako iloraz liczby potomstwa i liczby ciąży. Z kolei badania na tej samej populacji, przeprowadzone przez Wolc i wsp. [30] na podstawie modelu progowego zwierzęcia, wskazują na wyższą odziedziczalność – od 0,25 do 0,29 (w zależności od modelu). Gdzie zatem należy upatrywać przyczyn rozbieżności? Z pewnością, po części, w innej strukturze danych użytych do obliczeń. Jednak zróżnicowanie oszacowań wynika także z zastosowanej metodyki. Warto przypomnieć, że w klasycznym modelu liniowym zakłada się rozkład normalny obserwacji cechy (a ściślej tzw. reszt losowych). Rozkład plenności odbiega od krzywej Gaussa, co powoduje zawyżenie wariancji błędu, uitożsamianej z praktyce z wariancją środowiskową, wskutek czego oszacowania współczynników odziedziczalności są zaniżane (współczynnik odziedziczalności definiowany jest jako iloraz wariancji genetycznej do wariancji fenotypowej, będącej, w ujęciu ogólnym, sumą wariancji środowiskowej i wariancji genetycznej). Alternatywnym rozwiązaniem jest zastosowanie modelu progowego [24], co z kolei związane jest przede wszystkim z barierami natury numerycznej.

Należy zaznaczyć, że podobne dylematy towarzyszą ocenie parametrów genetycznych ciąży mnogich u bydła. Współczynniki odziedziczalności wskaźnika owulacji u bydła są również niewielkie. Systard [26] oszacował h^2 (dla norweskiej populacji bydła) na poziomie 0,006 (dla pierwszego wycielenia), natomiast w przypadku kolejnych wycieleń współczynnik ten był nieco wyższy i wynosił 0,04. Podobne wyniki uzyskano dla amerykańskich populacji bydła – od 0,08 do 0,16 [32, 33]. Analogicznie, jak w przypadku cytowanych wyżej badań dotyczących koni, także w przypadku bydła oszacowania dokonane na podstawie modelu progowego były wyższe, osiągając wartość 0,17 [31]. W przeciwieństwie do bydła, populacje koni pełnej krwi angielskiej są niewielkie i w konsekwencji intensywnej selekcji mogło dojść do kumulacji genotypów, których efektem są ciążę bliźniacze. Jednak z drugiej strony, poziom inbrodu oszacowany dla jednej z najlepszych polskich stadnin koni pełnej krwi angielskiej był niski – 0,88% [23].

Pozostając w kręgu analogii do badań prowadzonych na bydło, warto nawiązać do identyfikacji pojedynczych loci. Cruikshank i wsp. [7] podają, że potencjalne geny determinujące ciążę bliźniacze i owulacje mnogie u bydła mogą być zlokalizowane w chromosomach: 5, 7, 19 i 23. Chociaż najbardziej prawdopodobnym miejscem (w przypadku populacji północnoamerykańskiego bydła holsztyńskiego) jest chromosom 5, to jednak możliwe jest także ich umiejscowienie w innych, wyżej wymienionych, chromosomach. Nie są to jednak jedynymie miejsca potencjalnej lokalizacji genu ciąży mnogich u bydła. Pojawia się więc pytanie, czy mamy do czynienia ze współdziałaniem epistatycznym tych genów, ich niezależnym działaniem, czy specyficznym zróżnicowaniem w zależności od populacji? Karlsen i wsp. [13] podają, że zidentyfikowane loci odpowiadają za stosunkowo niewielką część zmienności fenotypowej wskaźnika owulacji (od 4 do 10%). Na marginesie należy przypomnieć, że plenność jest cechą dla której zidentyfikowano pojedyncze geny o znanym efekcie działania, np. u owiec [20]), czy świń [22]. Mimo niewielu badań dotychczas przeprowadzonych, sugestie takie rysują się także w odniesieniu do koni [28, 34].

Skutki ciąży mnogich u koni

Kulis i wsp. [14] oraz Wachowska [28] zgodnie stwierdzają, że ciążę dwupłodową klaczy z reguły kończą się poronieniem lub urodzeniem martwych źrebiąt, a nawet gdy urodzą się żywe, to są osłabione, co w rezultacie prowadzi do szybkiej śmierci. Tylko niewielki odsetek potomstwa z ciąży mnogich jest zdrowy, co jednak jest związane ze śmiercią drugiego płodu (jedynie w przypadku ok. 3% ciąży obydwu źrebiąt rodziły się żywe). Tym niemniej utrzymanie przy życiu obu bliźniąt nie ma dla hodowli większego znaczenia. Są one bowiem z reguły mniejsze od swoich rówieśników lub mają wady pokroju, w związku z czym eliminuje się je z hodowli. Szacuje się, że w krajowej hodowli koni pełnej krwi angielskiej tylko ok. 3% źrebiąt bliźniąt zostało skierowanych do prób wyścigowych [19]. Należy podkreślić, że większe szanse na przeżycie mają bliźnięta tej samej płci. Badania przeprowadzone na bydło wskazują, że największe prawdopodobieństwo przeżycia mają dwie jałówki [13]. Gorsze rokowania pojawiają się, gdy bliźnięta są różnej płci, a największą umieralność zaobserwowano w przypadku dwóch potomków męskich.

Ciąże mnogie u koni wiążą się z licznymi komplikacjami, takimi jak m.in.: różnice we wzroście jednego z bliźniąt; zaplątanie się sznurów pępowinowych, prowadzące do obumarcia obu płodów; bliźnięta syjamskie; zespół transfuzji płodowo-płodowej. Kolejnym zaburzeniem, któremu badacze poświęcili wiele uwagi jest frymartynizm. Jak podają Charon i Świtoński [6] frymartynizm jest najczęściej występującą formą interseksualizmu u zwierząt domowych. Dochodzi do niego wówczas, gdy w czasie ciąży mnogiej tworzą się anastomozy naczyń między łożyskami rozwijających się różnopłciowych płodów. Prowadzi to do zaburzenia rozwoju płciowego płodu żeńskiego i obecności u niego dwóch linii komórkowych – jednej własnej (układ chromosomów płci XX), a drugiej pochodzącej od współbliźniaka (układ XY). Jaszczak i Parada [11] stwierdzili, że nie ma zależności pomiędzy proporcją komórek XX:XY a stopniem zmian w układzie rozrodczym. Zmiany te zależą głównie od przenikania w trakcie rozwoju embrionalnego męskich hormonów płciowych (produkowanych przez męskiego bliźniaka), które zaburzają rozwój płciowy żeńskiego bliźniaka. Według Sysy [25] u bydła niemal 100% ciąży bliźniaczych prowadzi do powstania anas-

tomoz. Natomiast u owiec ciążyę mnogie są powszechne. Jednakże anastomozy są tu zjawiskiem rzadkim (0,8% łożysk). Tym niemniej wykryto, że u owiec chimerizm leukocytny jest dziedziczny. Przepuszczalnie wykształcenie anastomoz jest kontrolowane przez pojedynczy dominujący gen [27]. Co ciekawe, według niektórych autorów klacze pochodzące z ciąży bliźniaczych, u których stwierdzono chimerizm leukocytny, nie muszą być bezpłodne. Dowodzą tego chociażby badania przeprowadzone przez Jaszczaka i Paradę [12], którzy zbadali osiem heteroseksualnych bliźniąt. U czterech klaczy stwierdzili obecność chimerizmu leukocytnego, z czego dwie klacze w pierwszym sezonie rozrodczym urodziły zdrowe źrebięta. Również Bugno i wsp. [4] opisali płodną klacz z chimeryzmem leukocytnym, jednak w tym przypadku ciąża wystąpiła jedynie w siódmym roku życia i to po zastosowaniu inseminacji. Jeżeli anastomozy powstaną w trakcie życia płodowego po wykształceniu się układu rozrodczego, to wówczas klacz może być płodna. Interesujące są także wyniki badań przeprowadzonych nad tą anomalią u bydła. W badaniach Gregorego i wsp. [10] wykazano, że na 1014 przeanalizowanych bliźniąt zaledwie 4,3% krów (których bliźniakiem był samiec) było płodnych, a pozostałe (95,7%) były frymartynami. U niektórych frymartynów stwierdzono także obecność powiększonej lechtaczki, a co najmniej w jednym przypadku – worek mosznowy pod sromem.

Diagnostyka i minimalizowanie skutków

W celu ograniczenia strat, wynikających z ciąży mnogich, niezbędne jest przeprowadzanie badań diagnostycznych mających na celu kontrolę przebiegu owulacji. Dostępne metody różnią się między sobą zarówno precyzją, jak i kosztami. Badanie palpacyjne (rectal palpation) jest z reguły mało skuteczne, gdyż stosunkowo często polioowulacja nie zostaje zauważona. Zdecydowanie najdokładniejszą metodą monitorowania owulacji jest badanie ultrasonograficzne, związane jest to jednak z wyższymi kosztami. Badanie to pozwala na monitorowanie aktywności jajników oraz zapłodnionych komórek jajowych. Dzięki temu można stosunkowo łatwo stwierdzić czy należy klacz dopuścić do rozrodu. Warto zaznaczyć, że uzasadnione jest odsunięcie klaczy z polioowulacją jedynie wówczas, gdy wystąpiła już u niej ciąża mnoga. W przeciwnym wypadku można klacz pokryć, a następnie monitorować czy zapłodnieniu uległa jedna lub więcej komórek jajowych. Jest to działanie jak najbardziej uzasadnione, gdyż nawet jeżeli powstanie więcej zygot, to trzeba pamiętać o tym, że najczęściej większość z nich ulegnie samorzutnej redukcji [17]. Gdyby jednak tak się nie stało, to wówczas usunięcie drugiego płodu powinno nastąpić w czasie od 15. do 18. dnia ciąży [19]. Jedną z metod stosowanych w tym celu jest manualne zgniecenie jednego z rozwijających się pęcherzyków zarodkowych, co umożliwia prawidłowy rozwój drugiemu płodowi [1, 3]. Natomiast jeżeli ciąża bliźniacza rozwija się w obu rogach macicy, to w takim przypadku łatwiej jest usunąć jeden z embrionów. Połowa klaczy po takim zabiegu utrzymuje ciążę i rodzi zdrowe źrebię [29]. Niestety, mechanizm ten przestaje działać w przypadku ciąży mnogich pochodzących z owulacji niesynchronizowanych [19]. Wówczas jedną ze skutecznych metod jest punkcja pęcherza zarodkowego. Aby usunąć oba embriony, można zastosować również iniekcję prostaglandyn lub ich analogów przed wykształceniem się kubków endometrialnych. Następnie przeprowadza się krycie klaczy jeszcze w tym samym sezonie [3]. Dość radykalnym

sposobem jest natomiast stosowanie w takich przypadkach stresu żywieniowego. Drastyczne obniżenie dawki żywieniowej skutkuje obniżeniem poziomu progesteronów i obumarciem jednego lub dwóch zarodków [1].

Reasumując można zauważyć, że zarówno eliminowanie nadliczbowych embrionów, jak i usuwanie klaczy z hodowli nie rozwiązuje całkowicie problemu ciąży mnogich u koni. Również monitorowanie ultrasonograficzne, chociaż jest skuteczną metodą to jednak pociąga za sobą znaczne koszty. Jeżeli przypuszczenia dotyczące segregacji pojedynczego genu determinującego ciążę mnogie potwierdzą się, to wówczas, po zlokalizowaniu go i opracowaniu odpowiedniego testu molekularnego, możliwa będzie diagnostyka każdej klaczy przed dopuszczeniem jej do rozrodu. W ten sposób nie dojdzie do ponoszenia zbędnych, często wielokrotnych, kosztów związanych z klasyczną diagnostyką, a także do komplikacji wynikających z przebiegu takich ciąży. Zatem istnieje konieczność kontynuowania badań nad genetycznym uwarunkowaniem tej cechy, a przede wszystkim nad poszukiwaniem pojedynczych loci.

Literatura: 1. Bergman H.J., Vanrose G., Verraet P., Beedman D., Beckman D., de Kruijff A., 1998 – *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 67, 123. 2. Bresińska A., Wachowska L., Szwaczkowski T., 2004 – *Archiv fuer Tierzucht* 47, 119-127. 3. Bruck I., Anderson G.A., Hyland J.H., 1993 – *Australian Veterinary Journal* 70, 299-303. 4. Bugno M., Słota E., Tischner M., Kozubska-Sobocińska A., 1999 – *Annals of Animal Science* 26, 9-16. 5. Bulmer M.G., 1970 – *The biology of twinning in Man*, Clarendon Press, Oxford, London, 84-92. 6. Charon K.M., Świtoński M., 2004 – *Genetyka zwierząt*. PWN, Warszawa. 7. Cruickshank J., Dentine M.R., Berger P.J., Kirkpatrick B.W., 2004 – *Animal Genetics* 35, 206-212. 8. Davies Morel M.C.G., O'Sullivan J.A.M., 2001 – *Animal Reproduction Science* 66, 659-670. 9. Górecka A., 2003 – *Animal Science Papers and Reports* 21, 283-289. 10. Gregory K.E., Echternkamp S.E., Cundiff L.V., 1996 – *Journal of Animal Science* 74, 1223-1233. 11. Jaszczak K., Parada R., 1995 – *Prace i Materiały Zootechniczne* 47, 65-69. 12. Jaszczak K., Parada R., 1999 – *Animal Science Papers and Reports* 17, 115-121. 13. Karlsten A., Klemetsdal G., Ruane J., 2000 – *Animal Breeding Abstracts* 68, 1-8. 14. Kulisa M., Pieszka M., Frybes O., 1999 – *Medycyna Weterynaryjna* 55, 689-693. 15. Leszczyńska-Gorzela B., Oleszczuk J.J., Kıcıńska A., Sawulicka-Oleszczuk H., Keith L.G., 2000 – *Ginekologia Polska* 11, 1329-1333. 16. Mahon G.A.T., Cunningham E.P., 1982 – *Livestock Production Science* 9, 743-754. 17. Meier H.B., Gertsch U., Kochler S., 1997 – *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde* 139, 71. 18. Newcombe J.R., 1995 – *Veterinary Record* 137, 121-123. 19. Okólski A., 1985 – *Medycyna Weterynaryjna* 61, 492-494. 20. Owens J.L., Johnstone P.D., Davis G.H., 1985 – *New Zealand Journal of Agricultural Research* 28, 361-363. 21. Pawlak M., Torzyński G., Świtoński M., 2000 – *Animal Science Papers and Reports* 18, 157-163. 22. Rathje T.A., Rohrer G.A., Johnson R.K., 1997 – *Journal of Animal Science* 75, 1486-1494. 23. Sierszchulski J., Helak M., Wolc A., Szwaczkowski T., Schlote W., 2005 – *Animal Science Papers and Reports* 23, 51-59. 24. Skotarczak E., 2006 – *Estymacja parametrów genetycznych w modelu progowym zwierzęcia. Praca doktorska*, AR Poznań. 25. Sysa P., 1996 – *Nowa Weterynaria* 3, 2-7. 26. Systard O., 1984 – *Livestock Production Science* 11, 373-380. 27. Szatkowska I., Świtoński M., 1996 – *Hereditas* 124, 107-110. 28. Wachowska L., 2003 – *Genetyczne uwarunkowania ciąży bliźniaczych u koni pełnej krwi angielskiej. Praca magisterska*, AR Poznań. 29. Wierzbowski S., Kosiniak-Kamysz K., 1998 – *Kierowany rozród koni*. Drukol s.c. Kraków. 30. Wolc A., Bresińska A., Szwaczkowski T., 2006 – *Genetic and permanent environmental variability twinning in Thoroughbred horses estimated via three threshold models*. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 123 (w druku). 31. Van Tassel C.P., Van Vleck L.D., Gregory K.E., 1998 – *Journal of Animal Science* 76, 2048-2061. 32. Van Vleck L.D., Gregory K.E., Echternkamp S.E., 1991 – *Journal of Animal Science* 69, 3213-3219. 33. Van Vleck L.D., Gregory K.E., 1996 – *Journal of Animal Science* 74, 522-528. 34. Zoldag L., Partali C., Eszes F., 2001 – *Magyar Allatorvosok Lapja* 6, 360-365.