



脑瘫儿童骨代谢的生物标志物

BONE METABOLISM BIOMARKERS IN WALKING CHILDREN WITH CEREBRAL PALSY

© V.M. Kenis, S.L. Bogdanova, T.N. Prokopenko, A.V. Sapogovskiy, T.I. Kiseleva

The Turner Scientific Research Institute for Children's Orthopedics, Saint Petersburg, Russia

■ For citation: Kenis VM, Bogdanova SL, Prokopenko TN, et al. Bone metabolism biomarkers in walking children with cerebral palsy. *Pediatric Traumatology, Orthopaedics and Reconstructive Surgery*. 2019;7(4):79-86. <https://doi.org/10.17816/PTORS7479-86>

Received: 16.10.2019

Revised: 15.11.2019

Accepted: 09.12.2019

论证: 全身性骨质疏松症在脑麻痹骨科疾病的发病机制中具有重要意义。我们认为, 具有行走能力的脑瘫儿童具有骨代谢特征, 与无神经学背景的骨科疾病患者相比, 实验室参数的变化可以体现这一特征。

目的是确定脑性瘫痪患者的骨代谢的生物标志物, 以确定与无神经学背景的骨科病理学患者相比较的可能模式。

材料与方法: 我们评估的浓度钙、磷、骨吸收 β -crossLaps标记, 骨钙素、维生素D、I型胶原蛋白c末端前肽和血清碱性磷酸酶的活性50脑瘫患者从6到12岁规模水平的运动功能根据GMFCS I-III。对照组为足外翻畸形50例。

结果: 脑瘫患儿碱性磷酸酶活性为 170.25 ± 59.35 单位/升, 对照组为 145.58 ± 46.29 单位/升; 脑瘫组I型胶原c末端前肽浓度高于对照组(分别为 324.01 ± 174.10 和 269.68 ± 240.98)。 β -crossLaps的浓度、骨钙素、钙和维生素D的主要组低于儿童扁平足没有一般神经背景。

结论: 脑性瘫痪患儿骨代谢的生物标志物的变化能够独立运动, 其特征是骨吸收和骨吸收过程的活性平行增加。这使我们有可能联合使用激活骨合成代谢的药物或其底物(钙、维生素D)和抑制骨吸收的药物(特别是双膦酸盐)来预防和治疗脑瘫儿童的骨质疏松症。

关键词: 骨组织代谢; 生物标志物; 脑麻痹。

Background. Osteoporosis is an important factor in the pathogenesis of orthopedic manifestations in children with cerebral palsy. It was previously demonstrated that children with cerebral palsy have specific changes in bone metabolism, which can cause changes in laboratory parameters compared with other orthopedic patients without neurological backgrounds.

Aim. The aim of this study was to assess bone metabolism biomarkers in children with cerebral palsy, identifying distinguishing characteristic patterns in comparison with patients with orthopedic pathology without neurological backgrounds.

Materials and methods. This study evaluated the concentrations of calcium, phosphorus, β -cross laps, osteocalcin, vitamin D, CACP, and alkaline phosphatase in the blood serum of 50 children with cerebral palsy aged between 6 to 12 years with GMFCS levels I-III. The control group consisted of 50 patients with plano-valgus deformities of the feet.

Results. The alkaline phosphatase activity in the group of children with cerebral palsy was 170.25 ± 59.35 u/L, while in the control group it was 145.58 ± 46.29 u/L; the CACP concentration in the study group was higher than in the control group (324.01 ± 174.10 and 269.68 ± 240.98 , respectively). The concentration of β -cross laps, osteocalcin, calcium, and vitamin D in the study group was lower than in children with flat feet.

Conclusions. This study demonstrated multidirectional changes in the biomarkers of bone metabolism that are characteristic of walking children with cerebral palsy. These changes are characterized by a corresponding increase in

the activity of osteoresorption and osteoreparation. This makes it possible to justify the combined use of metabolites and metabolic activators (calcium and vitamin D) and drugs that suppress osteoresorption (bisphosphonates) for the prevention and treatment of osteoporosis in children with cerebral palsy.

Keywords: bone metabolism; biomarkers; cerebral palsy.

近几十年来, 儿童骨质疏松症的研究兴趣明显增加[1, 2]。许多因素会对儿童和青少年的骨量增加过程产生不利影响, 从而增加骨折的风险[3]。骨骼的机械强度由骨组织的大小、几何形状、质量和重量决定, 并取决于遗传、激素因素、体力活动和营养[4]的组合。

由于骨密度[5]的生理年龄相关动态变化, 儿童骨质疏松症的诊断较成人困难。2007年, 国际临床光密度测量学会发布了儿童骨质疏松症诊断指南和定义, 为骨质疏松症的诊断确立了标准: 根据密度测定法(双能x线骨密度测定法)和骨折史得出的低矿物质骨量[6]。双能x线骨密度仪最常用于评估骨组织[7]的骨密度, 但其在儿童中的应用与一定的方法局限性[8]有关。此外, 它没有给出一个想法的发病机制的骨矿化减少, 即增加分解代谢或减少合成代谢。

骨组织改变是全身性骨质疏松症[9]的标志, 在包括脑麻痹在内的儿童神经骨科疾病的发病机制中具有重要意义。神经肌肉疾病患者骨折的高风险在文献[10]中被广泛讨论。脑麻痹患者骨质疏松的危险因素为运动活性降低、轴向负荷、手术后固定、抗惊厥治疗、营养失调、生长速度低[11, 12]。然而, 尽管有明显的因果关系证据, 脑麻痹矫形病理的发病机制还没有得到充分的研究。

迄今为止, 对于患有包括脑麻痹在内的严重多系统疾病的儿童来说, 骨质疏松症的诊断是非常困难的[13]。在脑麻痹患者中, 由于定位困难(挛缩, 不对称的姿势, 植入物由于以前的手术)[14]密度测量可能是困难的。然而, 确定脑麻痹患者的骨组织状态

对于评估继发性疾病的风险, 以及畸形和骨折[15]的进展仍然具有重要意义。

近年来的许多研究表明, 根据GMFCS分类(大肌肉运动功能分类系统), 全球运动功能水平与骨密度之间存在直接关系: 脑麻痹患者的一般运动能力越差, 骨密度[16]越低。作者将这种模式与运动活动联系起来。然而, GMFCS 1和2以及4和5水平之间的总运动活性差异并不显著, 不足以完全解释吸收测定法的显著差异。此外, 在偏瘫和GMFCS 1患者中, 尽管负载[17]的差异很小, 但在轻瘫侧和完整侧的骨密度组织密度是不同的。作者认为, 不仅负荷的性质, 而且与主要神经系统疾病相关的更重要的因素, 决定了脑麻痹儿童骨密度的变化。

作为一种假设, 我们假设脑麻痹患者能够行走, 存在骨代谢的特征, 可以通过实验室参数的变化来体现, 与没有神经学背景的骨科疾病患者相比。为了验证这一假设, 我们决定对一组脑麻痹患者进行研究, 这些患者有行走能力, 肌肉骨骼系统有变形, 这些变形可能发生在没有神经系统疾病为主要诊断的骨科病理学患者中。因此, 我们采用了足外翻畸形。足部畸形是脑麻痹最常见的矫形表现, 也是本病外科治疗的主要适应证之一。足外翻畸形是脑麻痹中最常见的足畸形类型。在这方面, 我们发现有可能将脑麻痹患者的骨代谢指标、足部畸形患者的骨代谢指标和能够行走患者的骨代谢指标(GMFCS 1-3量表)与严重平足患者的骨代谢指标进行比较。

近年来, 所谓的骨质疏松症的生物标志物已被用于诊断和监测骨质疏松的情况。在这一术语下, 一组直接或间接反映成骨和

骨吸收过程强度的实验室指标组合在一起，可以监测疾病的病程和治疗效果。其中研究最多的是骨钙素、碱性磷酸酶、c末端前肽和1型胶原的羧基末端肽。对现有文献的分析表明，在最近的出版物中，没有关于脑麻痹患者中这些生物标志物的绝对和相对价值（与其他骨科病理类型的患者相比）的性质的数据。

骨钙素是一种羟基磷灰石结合蛋白，仅由成骨细胞和成牙细胞以及肥大过程中的软骨细胞合成。骨钙素是成骨细胞活性的晚期标志物，因此被用作骨合成代谢活性的指标。

碱性磷酸酶是存在于成骨细胞胞质膜上的一种膜结合酶。它在类骨质的形成和矿化过程中起着重要的作用，是成骨活性的一个指标。

型1胶原c末端前肽(CICP)是相应蛋白翻译后修饰的产物，主要在成骨细胞和成纤维细胞增殖中形成，是成骨细胞活性的指标。

型1胶原羧基末端肽(也称为CrossLaps)是相应蛋白的降解产物，以两种形式存在(α 和 β 异构体)。血清浓度的增加 β 形式(β -CrossLaps)可能表明骨吸收强度。

本研究的目的是通过测定脑瘫患者的生物标志物来确定骨代谢特征，并与无神经学背景的骨科病理学患者进行比较。

材料与方法

主要组为50例6~12岁(平均9.4岁)的脑瘫患者。所有患者均可根据潜在疾病的严重程度(GMFCS水平:1—8;2—17;3—25 分别为例)。对照组为50例5~13岁(平均8.3岁)足跖外翻畸形(高度活动的扁平足伴跟腱缩短—22岁);先天畸形—7例;

继发性和创伤后畸形9例。排除标准为前两年骨科手术的实施，以及伴随的需要持续治疗的神经和躯体疾病(包括癫痫)。

为了在手术治疗开始时确定骨组织代谢的生物标志物，接受全面检查的患者额外采集了3毫升静脉血。患者的父母被告知进行了额外的检查，并获得了他们的相关知情同意。

实验室分析方法。采用AU-480比色光度法测定血清中总钙、总磷和碱性磷酸酶活性。2~12岁儿童总钙的标准值为2.2-2.7 mmol/l;学龄前儿童磷含量—1.45-2.1 mmol/l,学龄—1.45-1.78 mmol/l;1-14岁—60-400单位/升儿童碱性磷酸酶活性。

β -CrossLaps的浓度、骨钙素、维生素D和CICP决定使用一个电化学发光免疫分析。计算不同年龄段儿童[18]的这些指标的参考值。

统计分析采用IBM SPSS Statistics v. 23软件包进行。根据Kolmogorov-Smirnov准则的计算，检验了分布的正态性。所得数据在各组中均呈正态分布。描述性统计的格式为 $M \pm S$ ，其中 M 为均值， S 为标准差。分布宽度为置信区间的95%。各研究组的参数采用独立样本的t检验进行评估，Levin检验的方差相等，因此可以使用t检验。差异有统计学意义 $p \leq 0.05$ 。

结果

两组患者资料对比分析结果见表。

从表中可以看出，脑麻痹患者的矿物质代谢与对照组(平足儿童)相比具有多向变化的特点。这些变化表现为骨吸收过程的增加和骨赔偿的激活。脑瘫组碱性磷酸酶

脑麻痹、扁平足患者骨代谢指标

变数	诊断	数值	均值 <i>t</i> 检验	
			<i>t</i>	双边意义
碱性磷酸酶, 单位/升	脑麻痹	170.25 ± 59.35	2.086	0.042*
	扁平足	145.58 ± 46.29		
磷, mmol / l	脑麻痹	1.51 ± 0.16	0.282	0.779
	扁平足	1.50 ± 0.24		
钙, mmol / l	脑麻痹	2.50 ± 0.09	2.069	0.043*
	扁平足	2.56 ± 0.05		
维生素D, ng / ml	脑麻痹	38.98 ± 15.34	1.785	0.080
	扁平足	50.26 ± 24.40		
β-CrossLaps, ng / ml	脑麻痹	1.37 ± 0.59	2.023	0.048*
	扁平足	1.78 ± 0.74		
骨钙素, ng / ml	脑麻痹	65.01 ± 25.98	1.444	0.047*
	扁平足	76.47 ± 36.92		
CICP, ng / ml	脑麻痹	324.01 ± 174.10	0.519	0.606
	扁平足	269.68 ± 240.98		

注: 脑麻痹, CICP — c末端型胶原前肽。* *t* 检验小于0.05。

活性为170.25 ± 59.35单位/升, 对照组为145.58 ± 46.29单位/升; 脑瘫组的CICP浓度高于对照组(分别为324.01 ± 174.10和269.68 ± 240.98), 但最后一项指标在本研究中未达到统计学差异。相反, β-CrossLaps的浓度, 骨钙素、钙、和维生素D的主要组低于儿童扁平足没有一般神经背景(除了最后指标, 差异具有统计学意义)。

讨论

矿物代谢紊乱可导致肌肉骨骼系统的继发性变化, 在许多与代谢的主要病理没有直接关系的骨科疾病中都有描述。这些疾病的发病机制尚不完全清楚。与负荷特性相关的机械因素(总体强度的降低, 高强度物种的限制, 特别是运动, 与畸形相关的肌肉骨骼系统的某些结构的机械过载)常被认为是一种可能的致病机制。在患有神经骨科疾病的儿童中, 导致骨矿化受损的最可能

因素被认为是整体运动活动的减少, 或所谓的无作为的骨质减少, 其特征是骨合成代谢的减少。然而, 研究表明, 使用激活骨合成代谢或骨形成底物(钙、维生素D)的药物不能使脑麻痹患者的骨密度正常化。因此, 近年来, 包括双膦酸盐在内的抑制骨吸收的药物在包括脑麻痹患者在内的骨质疏松症的治疗中得到了广泛的关注。关于使用双膦酸盐的一个理论反驳是, 它可能会降低骨合成代谢的活性, 从而导致其效率低下。此外, 降低骨的机械负荷也可能导致抗再吸收治疗的积极作用的缺失。

本研究的特点是比较了以足部畸形为主的独立运动组患者。

通过研究, 我们发现了影响脑麻痹患者骨力学特性的主要指标发生变化的一般趋势, 即骨吸收和骨分离的激活。特别是, 提高碱性磷酸酶的活性(每公升170.25 ± 59.35个单位的主要和对照组每

公升 145.58 ± 46.29 个单位), CIGP浓度($324,01 \pm 174,10$ 和 $269,68 \pm 240,98$)表明增加成骨细胞的活动研究集团的脑麻痹患者。作为骨合成代谢活性的指标,骨钙素和作为其调节因子的维生素D的浓度在无神经学背景的平足儿童中较高。描述骨吸收 β -CrossLaps的浓度,在主组低于儿童扁平足没有一般神经背景。

因此,我们所研究的反映骨代谢生物标志物的生物过程不能被简化为一个简单的公式来增强分解代谢过程或削弱合成代谢过程。在这方面,对脑麻痹患者骨代谢的影响可能的策略是通过联合使用适当的药物刺激骨合成代谢和抑制分解代谢。

妨碍我们对数据进行解释的因素可以被认为是一个相对较小的样本,主要群体的有限性质(根据GMFCS 1-3级别,有活动能力的残疾儿童)。因此,我们没有比较主要组和对照组患者的人体测量参数,尽管这可能在一定程度上影响结果。

生物标记物的参考值是针对不同年龄的儿童确定的,但是在文献中发现它们的分布比较广泛,缺乏明确的人群标准。在本研究的框架中,我们并没有设定确定上述生物标志物标准的目标。主要结果是对脑麻痹患者组与骨科病理相似但无神经学背景的患者各项指标进行比较分析。由于这项研究是在一个实验室的框架内进行的,我们认为缺乏我们自己的参考人口基数是一个不重要的因素。

尽管如此,本研究揭示的总体趋势相当明确地表明,代谢紊乱可对骨组织的矿物质密度产生负面影响,并导致骨组织力学性能的恶化,这在大多数骨科疾病儿童中都能观察到,主要是神经骨科疾病。

伴有原发性骨科病理和脑麻痹骨科表现的患者机械负荷特征的变化并不能解释所

发生的整个复杂变化。进一步的研究很可能使用更具体的和敏感的骨代谢指标,以及考虑到更详细的组的患者,将使我们能够建立骨科和神经的具体贡献因素在骨代谢的变化和脑麻痹患者的骨质疏松症的发病机理。

结论

儿童骨组织的状况,包括其强度特征,既取决于骨组织的初始性质,也取决于其代谢特征,同时还取决于作用于生长骨骼的外部机械因素。神经矫形外科疾病的一个特征是在这个系统的两个基本组成部分都发生了紊乱。我们已经证实了脑麻痹儿童骨骼代谢特征的生物标志物的多向变化,能够独立运动。所揭示的变化包括骨吸收、骨再分离过程活性的平行增加。这使我们能够证实联合使用激活骨合成代谢的药物或作为其底物(钙、维生素D)和抑制骨吸收的药物(特别是双膦酸盐)预防和治疗脑麻痹患者骨质疏松的可能性。

附加信息

资金来源。本研究是关于俄罗斯联邦卫生部国家任务执行情况的研究工作的一部分,编号为AAAA-A18-118122690159-9。

利益冲突。作者声明本文章的发表方面不存在明显或潜在的利益冲突。

伦理审查。该研究是根据《世界医学会赫尔辛基宣言》经俄罗斯卫生部修订的伦理标准进行,被俄罗斯联邦卫生部的联邦预算机构The Turner Scientific Research Institute for Children's Orthopedics道德委员会批准(2013年8月22日第7记录)。

病人的法律代表同意处理和公布个人资料。

作者贡献

V. Kenis — 研究概念与设计, 数据收集与处理, 文章撰写。

S. Bogdanova — 实验室研究, 撰写相应章节的文章。

T. Prokopenko — 患者的选择和临床检查, 资料处理。

A. Sapogovsky — 统计处理材料, 撰写相应的文章章节。

T. Kiseleva — 患者的选择和临床检查。

所有作者都对文章的研究和准备做出了重大贡献, 在发表前阅读并批准了最终版本。

References

- Щеплягина Л.А., Моисеева Т.Ю. Проблемы остеопороза в педиатрии: возможности профилактики // РМЖ. – 2003. – Т. 11. – № 27. – С. 1554–1556. [Shcheplyagina LA, Moiseeva TY. Problemy osteoporoz v pediatrii: vozmozhnosti profilaktiki. *RMZh*. 2003;11(27):1554-1556. (In Russ.)]
- Ward LM, Konji VN, Ma J. The management of osteoporosis in children. *Osteoporos Int*. 2016;27(7):2147-2179. <https://doi.org/10.1007/s00198-016-3515-9>.
- Sees JP, Sitoula P, Dabney K, et al. Pamidronate treatment to prevent reoccurring fractures in children with cerebral palsy. *J Pediatr Orthop*. 2016;36(2):193-197. <https://doi.org/10.1097/BPO.0000000000000421>.
- Marrani E, Giani T, Simonini G, Cimaz R. Pediatric osteoporosis: diagnosis and treatment considerations. *Drugs*. 2017;77(6):679-695. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0715-3>.
- Bachrach LK. Consensus and controversy regarding osteoporosis in the pediatric population. *Endocr Pract*. 2007;13(5):513-520. <https://doi.org/10.4158/EP.13.5.513>.
- Lewiecki EM, Gordon CM, Baim S, et al. Special report on the 2007 adult and pediatric Position Development Conferences of the International Society for Clinical Densitometry. *Osteoporos Int*. 2008;19(10):1369-1378. <https://doi.org/10.1007/s00198-008-0689-9>.
- Арсентьев В.Г., Асеев М.В., Баранов В.С., и др. Исследование минеральной плотности костной ткани у детей и подростков с дисплазиями соединительной ткани // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2010. – Т. 89. – № 5. – С. 73–77. [Arsent'ev VG, Aseev MV, Baranov VS, et al. Issledovanie mineral'noy plotnosti kostnoy tkani u detey i podrostkov s displaziyami soedinitel'noy tkani. *Pediatriia*. 2010;89(5):73-77. (In Russ.)]
- Weber DR, Boyce A, Gordon C, et al. The utility of DXA assessment at the forearm, proximal femur, and lateral distal femur, and vertebral fracture assessment in the pediatric population: the 2019 official pediatric positions of the ISCD. *J Clin Densitom*. 2019;22(4):567-589. <https://doi.org/10.1016/j.jocd.2019.07.002>.
- Каладзе Н.Н., Урзина Е.О. Характеристика структурно-функционального состояния костной ткани и минерального обмена у детей, больных церебральным параличом // Вестник физиотерапии и курортологии. – 2017. – Т. 23. – № 3. – С. 50–57. [Kaladze NN, Ursina EO. Characteristics of the structural-functional state of bone tissue and mineral exchange in children, patients with cerebral paralysis. *Vestnik fizioterapii i kurortologii*. 2017;23(3):50-57. (In Russ.)]
- Yaşar E, Adigüzel E, Arslan M, Matthews DJ. Basics of bone metabolism and osteoporosis in common pediatric neuromuscular disabilities. *Eur J Paediatr Neurol*. 2018;22(1):17-26. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2017.08.001>.
- Пырьева Е.А., Сорвачева Т.Н., Сафронова А.Н. Нутритивная поддержка в лечении детей с неврологической патологией // Вопросы детской диетологии. – 2016. – Т. 14. – № 1. – С. 47–53. [Pyreva EA, Sorvacheva TN, Safronova AN. Nutritive support in treatment of children with neurological pathology. *Problems of pediatric nutrition*. 2016;14(1):47-53. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.20953/1727-5784-2016-1-47-53>.
- Kilpinen-Loisa P, Pihko H, Vesander U, et al. Insufficient energy and nutrient intake in children with motor disability. *Acta Paediatr*. 2009;98(8):1329-1333. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2009.01340.x>.
- Unay B, Sarici SU, Vurucu S, et al. Evaluation of bone mineral density in children with cerebral palsy. *Turk J Pediatr*. 2003;45(1):11-14.
- Houlihan CM, Stevenson RD. Bone density in cerebral palsy. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2009;20(3):493-508. <https://doi.org/10.1016/j.pmr.2009.04.004>.
- Henderson RC, Kairalla JA, Barrington JW, et al. Longitudinal changes in bone density in children and adolescents with moderate to severe cerebral palsy. *J Pediatr*. 2005;146(6):769-775. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2005.02.024>.

16. Akhter N, Khan AA, Ayyub A. Motor impairment and skeletal mineralization in children with cerebral palsy. *J Pak Med Assoc.* 2017;67(2):200-203.
17. Finbråten AK, Syversen U, Skranes J, et al. Bone mineral density and vitamin D status in ambulatory and non-ambulatory children with cerebral palsy. *Osteoporos Int.* 2015;26(1):141-150. <https://doi.org/10.1007/s00198-014-2840-0>.
18. Ивашикина Т.М., Котова Т.Н., Омарова П.Ш., и др. Возрастная динамика уровня сывороточных костных маркеров у здоровых детей // Клиническая лабораторная диагностика. – 2010. – № 11. – С. 7–10. [Ivashikina TM, Kotova TN, Omarova PS, et al. Age-related changes in the level of serum bone markers in healthy children. *Russian clinical laboratory diagnostics.* 2010;(11):7-10. (In Russ.)]

Information about the authors

Vladimir M. Kenis* — MD, PhD, D.Sc., Professor, Deputy Director of Development and International Relations, Head of the Department of Foot Pathology, Neuroorthopedics and Systemic Diseases. The Turner Scientific Research Institute for Children's Orthopedics, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-7651-8485>. E-mail: kenis@mail.ru.

Svetlana L. Bogdanova — MD, Head of the Clinical Diagnostic Laboratory. The Turner Scientific Research Institute for Children's Orthopedics, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0003-3737-4519>. E-mail: svetlanabogdanova1969@mail.ru.

Tatyana N. Prokopenko — MD, Pediatrician of the Consultative and Diagnostic Center of the The Turner Scientific Research Institute for Children's Orthopedics, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-0498-2510>. E-mail: prokopenkotn@mail.ru.

Andrei V. Sapogovskiy — MD, PhD, Research Associate of the Department of Foot Pathology, Neuroorthopedics and Systemic Diseases. The Turner Scientific Research Institute for Children's Orthopedics, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-5762-4477>. E-mail: sapogovskiy@gmail.com.

Tatyana I. Kiseleva — MD, Orthopedic and Trauma Surgeon of the Department of Foot Pathology, Neuroorthopedics and Systemic Diseases. The Turner Scientific Research Institute for Children's Orthopedics, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0003-1886-3544>. E-mail: orthokis@mail.ru.