

УДК 616.152.21:616.136.41-089.27:616.36

## НО-ЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИХ СВОЙСТВ КРОВИ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

В.В. Зинчук, А.Н. Глебов

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

*Проводится анализ литературных и собственных данных о роли NO-зависимых механизмов и кислородсвязывающих свойств крови в развитии окислительного стресса, индуцированного липополисахаридом. Целенаправленное воздействие на кислородтранспортную функцию крови и активность L-аргинин-NO системы может быть использовано в качестве эффективного пути коррекции процессов перекисного окисления липидов, состояния антиоксидантной системы и составить одно из ведущих направлений терапии состояний, характеризующихся нарушением прооксидантно-антиоксидантного равновесия.*

**Ключевые слова:** окислительный стресс, сродство гемоглобина к кислороду, перекисное окисление липидов, оксид азота.

*The literature and our own data about the role of NO-dependent mechanisms and blood oxygen-binding properties in the development of lipopolysaccharide-induced oxidative stress were analyzed. The directed influence on the blood oxygen transport and activity of L-arginine-NO-system may be used as an effective way to correct the lipid peroxidation processes and the state of antioxidant system and become one of the leading approaches in treatment of states of oxidant-antioxidant dysbalance.*

**Key words:** oxidative stress, hemoglobin-oxygen affinity, lipid peroxidation, nitrogen monooxide.

Исследования последних лет привели к пониманию того, что большинство патологических процессов в человеческом организме сопряжено с нарушениями прооксидантно-антиоксидантного баланса [3, 8]. Окислительные процессы, сопровождающиеся образованием токсических, вследствие своей высокой реактивности, активных форм кислорода (АФК), органических и неорганических перекисных соединений, являются неотъемлемой частью функционирования живого организма также, как и антиоксидантные механизмы, осуществляющие их дезактивацию [21]. При нарушении баланса этих компонентов на фоне тяжелых патологических состояний происходит избыточное накопление свободных радикалов и продуктов их реакций, что приводит к биохимическим и структурным нарушениям клеток: изменению проницаемости клеточных мембран, нарушению межклеточного взаимодействия, обменных процессов [18, 27, 31]. Метаболические нарушения, возникающие на клеточном уровне, обуславливают развитие функциональной несостоятельности различных органов и тканей, срыв адаптационных ресурсов [19], приводят к возникновению окислительного стресса [13].

В случае превышения возможности конститутивных защитных систем от избытка внутриклеточной концентрации продуктов неполного восстановления кислорода возникает окислительный стресс, на который клетки реагируют депрессией ряда совместно регулируемых генов, белки которых ответственны за удаление реакционно-способных соединений или восстановление клеточных повреждений [2]. Функционирование различных компонентов антиоксидантной системы (АС) часто рассматривается изолированно от остальных систем клеток [11]. Высшие организмы имеют глубокоэшелонированную систему защиты от кисло-

рода, первый уровень которой заключается в его снижении в тканях до концентрации, насыщающей цитохромоксидазу, но недостаточной для образования АФК [23]. В организме существует каскадная система снижения  $pO_2$  до оптимального его значения в клетке и далее в митохондриях [17]. Согласно современным представлениям, основным на системном подходе организации физиологических процессов [24], система антиоксидантной защиты представляет собой сложную, ауторегулируемую, многокомпонентную метаболическую цепь, компоненты которой функционируют, дополняя друг друга [9, 14]. При выраженном и длительном переокислении липидов наступает истощение эндогенных биоантиокислителей; дополнительное поступление их замедлено вследствие нарушения проницаемости клеточных мембран. В результате это приводит к резкому снижению эндогенных биоантиоксидантов, что обуславливает необходимость поиска новых подходов антиоксидантного и мембраностабилизирующего действия.

В настоящее время считается доказанным, что в патогенезе многих патологических состояний лежат механизмы активации окислительных процессов, сопровождающиеся угнетением антиоксидантной защиты [25, 26]. Возникающие в процессе действия эндотоксина биохимические и структурные изменения клеток приводят к серьезным метаболическим нарушениям в организме: снижаются активность ингибиторов протеиназ, нарушаются многие физиологические процессы, взаимосвязь важнейших биохимических реакций. В организме накапливаются токсические продукты, вызывающие повреждение механизмов общей резистентности и усиливающие окислительный стресс, что приводит к серьезным нарушениям в функционировании окислительной и антиокислительной сис-

тем организма: на фоне тканевой гипоксии резко активируются процессы перекисидации при одновременном подавлении активности АС [15].

В наших исследованиях установлено, что окислительный стресс сопровождается существенными, однонаправленными, хотя и не однозначными по степени выраженности изменениями кислород-транспортной функции (КТФ) крови, коррелирующими с активностью процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), как у кроликов [4, 5], так и у крыс [6, 28]. Развитие данной формы стресса (при введении эндотоксина) характеризуется активацией процессов ПОЛ и снижением антиоксидантного потенциала в крови у кроликов [4]. Происходит повышение содержания диеновых конъюгатов (ДК) и оснований Шиффа (ОШ), а также снижение активности каталазы и содержания  $\beta$ -токоферола в условиях активации процессов свободнорадикального окисления липидов в плазме и эритроцитах, отмечаются значительные ухудшения кислородсвязывающих свойств крови [5]. Окислительный стресс у кроликов характеризовался развитием гипоксии, которая была ещё более выражена в условиях введения неселективного ингибитора NO-синтазы метилового эфира  $N^G$ -нитро-L-аргинина (L-NAME). С учётом реальных значений pH,  $pCO_2$  и температуры тела через 240 минут после введения липополисахарида (ЛПС) показатель  $p50_{\text{реал}}$  возрастал на 9,3 % ( $p < 0,05$ ). После введения неселективного ингибитора NO-синтазы (L-NAME) при окислительном стрессе  $p50_{\text{реал}}$  увеличивался на 31,3 % ( $p < 0,001$ ) и 29,5 % ( $p < 0,001$ ) на 120-ой и 240-ой минутах, что отражало более выраженный сдвиг реальных кривых диссоциации оксигемоглобина (КДО) вправо (рис. 1).

Известные механизмы антиоксидантной защиты на клеточном уровне, не предотвращая образование супероксидного аниона и других активных интермедиатов, способны лишь в определённых пределах устранять «свободнорадикальное зло» [21, 22], что предопределяет интерес к другим факторам АС. Гемоглобин, изменяя своё средство к кислороду, может регулировать поток кислорода в ткани в соответствии с их потребностью в нём и, тем самым, предупреждать избыточное его ис-

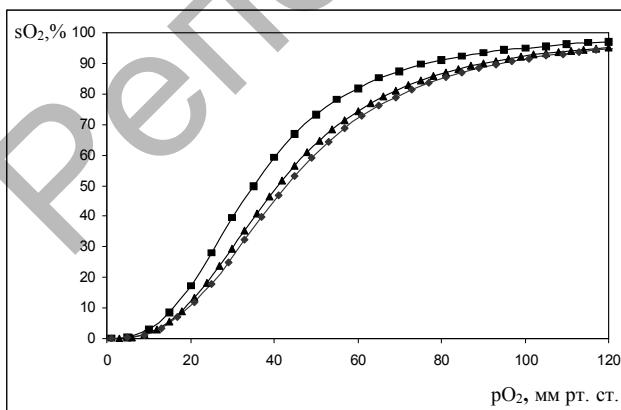


Рис. 1. Кривые диссоциации оксигемоглобина при реальных значениях pH,  $pCO_2$  и температуры у кроликов при окислительном стрессе в условиях применения L-NAME: исходный уровень (■), 120-я (◆) и 240-я (▲) минуты эксперимента

пользование для свободнорадикального окисления, что позволяет рассматривать средство гемоглобина к кислороду (СГК) как один из факторов, участвующих в поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма [1, 14]. Составной частью защитных механизмов при инициируемом гидроперекисями окислительном стрессе является оксигемоглобин, про- либо антиоксидантные качества которого зависят как от его кислородсвязывающих свойств, так и от состояния самой молекулы гемоглобина [10]. Предполагается возможность ослабления прооксидантного потенциала модифицированным гемоглобином [30]. Показано участие СГК в поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия при целенаправленном его повышении в условиях введения ЛПС в малых дозах [32].

Гемоглобин регулирует вытеснение оксида азота (NO), а поскольку кровоток регулируется наномолярными уровнями нитрозотиолов, его образование важно не только для расширения кровеносных сосудов, но и оксигенации крови и тканей [16, 37]. На наш взгляд, значение NO-соединений с гемоглобином необходимо оценивать и через их эффект на СГК. Их влияние на модуляцию кислородсвязывающих свойств крови проявляется при высоких концентрациях (5 и более %), но в то же время их эффект может иметь важное значение для процессов газообмена на уровне капилляра [33, 34]. Следует учитывать гетерогенность эндотелия по NO-образующей функции по ходу сосудистого русла. Различия эндотелия по активности NO-синтаз и особенности объёмного содержания крови (на долю терминальных артериол и капилляров приходится 69 % от общей площади сосудистой системы, объём содержащейся в них крови составляет 10 %) в различных отделах сердечно-сосудистой системы предполагает более высокое содержание NO и его производных на микроциркуляторном участке сосудистого русла (в 100 и более раз) и, соответственно, его большую долю, непосредственно взаимодействующую с гемоглобином. На уровне микроциркуляции это может быть чрезвычайно важным для модификации функциональных свойств гемоглобина и его участия в формировании потока кислорода в ткани, поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия в организме [35].

Внутривенное введение крысам ЛПС в дозе 5,0 мг/кг вызывало развитие окислительного стресса, сопровождавшегося ростом уровня ДК и ОШ в исследуемых тканях [7] и снижением в них активности каталазы и содержания  $\alpha$ -токоферола. L-аргинин, неселективный ингибитор NO-синтазы (L-NAME) не уменьшали нарушения прооксидантно-антиоксидантного состояния, в то время как введение селективного ингибитора индуцибельной изоформы NO-синтазы L-лизина- $N^G$ -ацетамидина (L-NIL) обладало защитным эффектом. Ингибирование индуцибельной изоформы NO-синтазы при введении эндотоксина, ведущего к росту содержания свободных радикалов в 20-50 раз, не всегда оказывается эффективным, что, по-видимому, связано с участием других нейрогуморальных механиз-

мов [20]. Существенных различий в изменении показателей прооксидантно-антиоксидантного баланса при окислительном стрессе, индуцированном введением ЛПС, в условиях модуляции как L-аргинин-NO системы, так и введения кверцетина, не выявлено. Установлено антиоксидантное действие экзогенных растительных фенолов (в т.ч. флавоноидов), обладающих способностью предупреждать возникновение свободных радикалов, нейтрализовать развитие эффектов АФК путём предотвращения пероксидации липидов и образования хелатных комплексов с металлами, что определяет высокую биологическую активность флавоноидов, которые защищают от окисления другие соединения или способствуют их восстановлению [12].

При окислительном стрессе у крыс показатель  $p50_{\text{станд}}$  возрос с  $32,8 \pm 0,72$  до  $38,3 \pm 0,91$  ( $p < 0,001$ ) мм рт. ст. С учётом реальных величин pH,  $pCO_2$ , температуры  $p50_{\text{реал}}$  имел значение  $47,2 \pm 0,37$  мм рт. ст. ( $p < 0,001$ ), что вызывало сдвиг КДО вправо в сравнении с контролем, в контроле значение  $p50_{\text{реал}}$  составило  $38,0 \pm 0,44$  мм рт. ст. Модуляция окислительного стресса путём введения L-NAME, L-аргинина и их комбинации существенно не влияла на данный характер изменения SGK. Применение L-NIL уменьшало  $p50_{\text{станд}}$  на 8,6 % ( $p < 0,02$ ), хотя в сравнении с контролем он был выше на 6,7 % ( $p < 0,05$ ); показатель  $p50_{\text{реал}}$  также уменьшался на 10,6 % ( $p < 0,001$ ) в сравнении с группой животных, получавших ЛПС. В опытах с введением кверцетина в условиях окислительного стресса отмечалось уменьшение SGK, что проявлялось в увеличении  $p50$  как при стандартных, так и реальных значениях pH,  $pCO_2$  и температуры. Их прирост, в сравнении с контрольной группой, составил 7,3 % ( $p < 0,02$ ) и 17,1 % ( $p < 0,001$ ) соответственно, что было на 8,1 % ( $p < 0,01$ ) и 5,7 % ( $p < 0,001$ ) меньше, чем в группе животных с окислительным стрессом. Соответствующие КДО при стандартном и реальном значении pH,  $pCO_2$  и температуры смещались вправо. Характер изменения SGK при использовании кверцетина и L-NIL примерно такой же. Изменение SGK через NO-зависимые механизмы различной природы может влиять не только на поток кислорода в ткани, но и на прооксидантно-антиоксидантный баланс организма при окислительном стрессе (рис. 2).

Высокие дозы нитроглицерина (источник NO) вызывают увеличение образования  $HbFe^{2+}NO$ , коррелирующее с ростом значения  $p50$  и соответствующим сдвигом кривой диссоциации оксигемоглобина вправо [29]. В опытах у животных, получавших L-аргинин и подвергавшихся гипотермии, отмечался наименьший сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина влево [34].

Ингибирование образования NO вызывает сдвиг прооксидантно-антиоксидантного равновесия, очевидно, не только в связи с потенциально высокими его потоками, которые могут реагировать со многими молекулами-мишенями, определяя развитие окислительного стресса, а как следствие снижения вклада других факторов в антиоксидантный потенциал организма и, в частности, изменение SGK [16, 36]. Степень дисбаланса показателей



Рис. 2. Участие кислородсвязывающих свойств крови в патогенезе окислительного стресса, индуцированного липополисахаридом

прооксидантно-антиоксидантного равновесия у животных с повышенным SGK при введении ЛПС была наименьшей, модуляция L-аргинин-NO системы при этом практически не влияла на уровень ОШ и содержание антиоксидантов [15], что предполагает схожесть механизмов их антиоксидантного действия.

Результаты выполненных исследований доказывают, что инфузия селективного ингибитора индуцибельной NO-синтазы L-NIL при окислительном стрессе, индуцированном ЛПС, уменьшает кислородную недостаточность, обуславливает наименьший дисбаланс прооксидантно-антиоксидантного состояния, в то время как введение неселективного ингибитора NO-синтазы или L-аргинина не вызывает улучшения антиоксидантной защиты. При смещении КДО вправо (введение ЛПС) наблюдается сдвиг прооксидантно-антиоксидантного равновесия в сторону активации ПОЛ и снижение резерва антиоксидантной системы. Выявлен однонаправленный характер изменений показателей прооксидантно-антиоксидантного статуса и КТФ крови при окислительном стрессе, индуцированном введением ЛПС, а также их выраженность в условиях модуляции как L-аргинин-NO системы, так и введения кверцетина. Отсутствие потенцирования их эффекта обусловлено общими механизмами, лежащими в основе генеза этого состояния, и участия в нём кислородсвязывающих свойств крови и NO. Представляется перспективным создание фармакологических средств, механизм действия которых основан на образовании адекватных количеств NO, для коррекции осложнений, вызываемых ЛПС. Выявленные изменения КТФ крови, прооксидантно-антиоксидантного баланса у кроликов и крыс при введении ЛПС в условиях модуляции L-аргинин-NO системы и АС организма отражают участие исследуемых механизмов в патогенезе окислительных повреждений органов. Целенаправленным воздействием на механизмы транспорта кислорода кровью и образования NO можно ослабить повреждающее действие ЛПС.

Таким образом, из анализа результатов иссле-

дований, следует, что выявленные закономерности характера изменений кислородсвязывающих свойств крови, ПОЛ и АС при действии ЛПС указывают на сложный механизм участия системы транспорта кислорода, L-аргинин-NO системы в поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма. Оценка их роли не может быть строго однозначной, к этой проблеме следует подходить дифференцированно. Важным является приведение кислородсвязывающих свойств крови в соответствие с потребностями тканей в кислороде при окислительном стрессе, что составляет ведущую направленность функционирования физиологических механизмов антиоксидантной защиты организма. Результаты выполненных исследований свидетельствуют о наличии регуляторной роли кислородсвязывающих свойств крови в механизмах поддержания прооксидантно-антиоксидантного равновесия при окислительном стрессе, индуцированном введением ЛПС, реализуемом через NO-зависимые механизмы формирования кислородтранспортной функции крови. Целенаправленное воздействие на кислородтранспортную функцию крови и активность L-аргинин-NO системы с помощью фармакологических средств может быть использовано в качестве эффективного пути коррекции процессов ПОЛ, состояния АС, повышения устойчивости организма к действию эндотоксинов и составить одно из ведущих направлений терапии состояний, характеризующихся нарушением прооксидантно-антиоксидантного равновесия.

Данная работа выполнена частично благодаря финансовой поддержке Фонда фундаментальных исследований РБ (№Б05-040).

#### Литература

- Борисюк М.В. Система транспорта кислорода // Сборник науч. трудов под ред. М.В. Борисюка - Гродно, 1989. - С. 3-5.
- Брюханов А.Л., Нетрусов А.И. Каталаза и супероксиддисмутаза: распространение, свойства и физиологическая роль в клетках строгих анаэробов // Биохимия. - 2004. - Т. 69, № 9. - С. 1170-1186.
- Владимиров Ю.А. Свободные радикалы // Вестн. Рос. АМН. - 1998. - № 7. - С. 43-51.
- Глебов А.Н., Зинчук В.В. Особенности изменений механизмов транспорта кислорода крови и их роль в адаптивных реакциях при окислительном стрессе // X съезд Белорусского общ. физиологов: Тез. докл. науч. конф. - Мн., 2001. - С. 37-38.
- Глебов А.Н., Зинчук В.В. Кислородтранспортная функция крови и прооксидантно-антиоксидантное состояние организма при окислительном стрессе // Вестн. НАН Беларуси. Сер. мед.-биол. наук. - 2002. - № 2. - С. 71-73.
- Глебов А.Н., Зинчук В.В. Кислородтранспортная функция крови крыс при введении липополисахарида в условиях коррекции L-аргинин-NO системы // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. - 2005. - Т. 91, № 9. - С. 1052-1059.
- Глебов А.Н., Зинчук В.В. Прооксидантно-антиоксидантное состояние организма при окислительном стрессе в условиях коррекции L-аргинин-NO системы // Бюл. экспер. биол. и мед. - 2006. - Т. 141, № 4. - С. 368-370.
- Донскова Ю.С., Осипова Н.А., Якубовская Р.И. и др. Состояние антиоксидантной и иммунной систем у онкологических больных на этапах хирургического лечения с интраоперационной радиотерапией // Анестезиол. и реаниматол. - 2004. - № 3. - С. 67-70.
- Дугиева М.З., Багдасарова З.З. Клиническая эффективность антиоксидантной терапии в хирургической практике // Анестезиол. и реаниматол. - 2004. - № 2. - С. 73-75.
- Заводник И.Б., Лапшина Е.А. Процессы окисления гемоглобина человека // Биохимия. - 1996. - Т. 61, № 1. - С. 42 - 48.
- Зайцев В.Г., Закревский В.И. Методические аспекты исследований свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма // Вестн. Волгоградской мед. акад. - 1998. - № 4. - С. 49-53.
- Залесский В.И., Великая Н.В. Антиапоптические, проапоптические и антитоксические реакции молекул флавоноидов - растительных фенолов // Проблемы харчування. - 2003. - №1. - С. 38-43.
- Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньшикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. М., 2001. - 343 с.
- Зинчук В.В., Борисюк М.В. Роль кислородсвязывающих свойств крови в поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма // Усп. физиол. наук. - 1999а. - Т. 30, № 3. - С. 38-48.
- Зинчук В.В. Прооксидантно-антиоксидантное состояние организма при введении липополисахарида в условиях коррекции средства гемоглобина к кислороду и L-аргинин-NO-системы // Бюл. экспер. биол. и мед. - 2001б. - Т. 131, № 1. - С. 39-42.
- Зинчук В.В. Участие оксида азота в формировании кислородсвязывающих свойств гемоглобина // Усп. физиол. наук. - 2003. - Т. 34, № 2. - С. 33-45.
- Коваленко Е.А., Черняков И.Н. Кислород тканей при экстремальных факторах полета // Проблемы космической биол. - М., 1972. - Т. 21. - 264 с.
- Маркель А.Л., Елинова В.И., Храмова В.В. Роль оксидативного стресса в патогенезе артериальной гипертензии у крыс линии нисаг // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. - 2001. - Т. 87, № 5. - С. 594-599.
- Меерсон Ф.З. Адаптационная медицина: механизмы и защитные эффекты адаптации. - М.: Hiroxia medical Ltd., 1993. - 332с.
- Проскураков С.Я., Филимонова М.В., Верховский Ю.Г. и др. Влияние ингибитора NO-синтазы 2-ADT на эндотоксининдуцированные изменения гемодинамики и дыхания крыс // Бюл. экспер. биол. и мед. - 2004. - Т. 138, № 10. - С. 446-449.
- Скулачев В.П. Нефосфорилирующее дыхание как механизм, предотвращающий образование активных форм кислорода // Молекулярная биол. - 1995. - Т. 29, № 6. - С. 1199-1209.
- Скулачев В.П. Кислород в живой клетке: добро или зло? // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колонопроктологии. - 1999. - № 1. - С. 12-18.
- Скулачев В.П. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - сенсоры легких и кровеносных сосудов и их роль в антиоксидантной защите организма // Биохимия. - 2001. - Т. 66, № 10. - С. 1425-1429.
- Судаков К.В. Основные принципы общей теории функциональных систем // Под ред. К.В. Судакова. Функциональные системы организма. - М.: Медицина, 1987. - С. 26-48.
- Anname D., Aegerter P., Jars-Guinestre M.C., Guidet B. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. - 2003. - № 1687. - P. 165-172.
- Cadenas S., Cadenas A.M. Fighting the stranger - antioxidant protection against endotoxin toxicity // Toxicology. - 2002. - Vol. 180. - P.45-63.
- Esprey M.G., Miranda K.M., Feelisch M. e.a. Mechanisms of cell death governed by the balance between nitrosative and oxidative stress. // Ann. N. Y. Acad. Sci. - 2000. - Vol. 899. - P. 209-221.
- Glebov A.N., Zinchuk V.V. Blood oxygen-carrying function during the oxidative stress induced by lipopolysaccharide with a modification of the L-arginine-NO pathway // Annales Academiae Medicae Bialostocensis. - 2005. - Vol. 50. - P. 247-251.
- Kosaka H., Seiyama A. Physiological role of nitric oxide as an enhancer of oxygen transfer from erythrocytes to tissues // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1996. - Vol. 218, № 3. - P.749-752.
- Privalle C., Talarico T., Keng T., DeAngelo J. Pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene: a nitric oxide scavenger with antioxidant activity for the treatment of nitric oxide induced shock. // Free Radic. Biol. Med. 2000. - Vol. 15. - P. 1507-1517.
- Spronk P.E., Zandstra D.F., Ince C. Bench-to-bedside review: Sepsis is a disease of the microcirculation // Crit. Care. - 2004. - Vol. 8, № 6. - P. 462-468.
- Zinchuk V.V., Borisjuk M.V. Fe<sup>2+</sup>-Initiated chemiluminescence in rats with high hemoglobin-oxygen affinity during fever // J. Physiol. and Pharmac. - 1997. - Vol. 48, № 1. - P. 113-119.
- Zinchuk V., Borisjuk V. The effect of NO synthase inhibition on blood oxygen-carrying function during hyperthermia in rats // Respiration Physiology. - 1998. - Vol. 113, № 1. - P. 39-45.
- Zinchuk V.V., Dorokhina L.V. Blood oxygen transport in rats under hypothermia combined with modification of the L-arginine-NO pathway // Nitric Oxide. - 2002. - Vol. 6, № 1. - P. 29-34.
- Zinchuk V.V., Dorokhina L.V., Maltsev A.N. Prooxidant-antioxidant balance in rats under hyperthermia combined with modified hemoglobin-oxygen affinity // Journal of Thermal Biology. - 2002. - Vol. 27, № 5. - P. 345-352.
- Zinchuk V.V., Khodosovsky M.N., Maslakov D.A. Influence of different oxygen modes on the blood oxygen transport and prooxidant-antioxidant status during hepatic ischemia/reperfusion // Physiol. Res. - 2003. - Vol. 52, № 5. - P.533-544.
- Zinchuk V.V., Pronko T.P., Lis M.A. Blood oxygen transport and endothelial dysfunction in patients with arterial hypertension // Clin. Physiol. Nucl. Med. - 2004. - Vol. 24. - P. 205-211.