

РОЛЬ БРЮШИНЫ В ТРАНСПОРТЕ ВОДЫ И ГАЗОВ

Кафедра военно-полевой хирургии военно-медицинского факультета в УО «БГМУ»

В обзоре систематизированы данные об открытии аквапоринов, механизмах транспорта воды и газов аквапорином-1 (AQP1) в брюшине, описана структура, функция и регуляция аквапоринов брюшины.

Ключевые слова: аквапорин-1, брюшина, транспорт воды и газов.

Историческая справка. В конце XIX, начале XX веков многие ученые, изучавшие транспорт воды через биологические мембраны заметили, что этот транспорт обратимо ингибировался химическими соединениями, содержащими ртуть. Учитывая, что для простой физико-химической диффузии ингибиторов не существует, было сделано предположение о существовании специфических белковых структур, участвующих в транспорте воды, но все усилия по идентификации их оказались тщетными [4].

В конце XX века произошел серьёзный прорыв в представлении о транспорте воды через клеточную мембрану. Этому способствовали работы Питера Эгра (Peter Agre) (рис. 1). Который в 1988 году сумел выделить неизвестный ранее мембранный протеин CHIP28 с молекулярной массой 28 000 Да и через год идентифицировал его как искомый водный канал.

Найденный белок получил название аквапорин-1. Вскоре только в тканях млекопитающих было выявлено 13 белковых структур подобных аквапорину-1 [9, 21]. В клетках растений найдено более 35 видов аквапоринов. К настоящему времени известно около 200 разновидностей белков водных каналов у растений и животных.

В 2000 – 2001 годах Эгр и его коллеги смогли установить аминокислотную последовательность белка и затем клонировали участок ДНК, кодирующий синтез аквапорина-1. Затем была установлена пространственная структура аквапорина-1 бактерий. Она напоминает цилиндрический канал, по которому движутся молекулы воды (рис. 2). Полученная структуры синтезированного соединения помогло понять механизм действия этого белка.

Последовательность аминокислот в белковой структуре канала такова, что создаваемое ими электростатическое поле в центре молекулы «переключается» на обратную полярность. Поэтому через него проходит только вода, но не ионы.

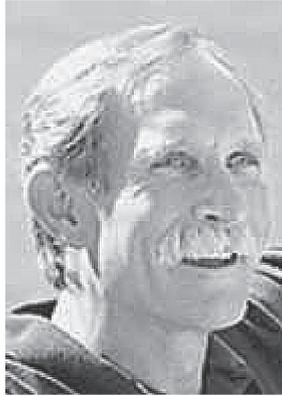


Рис. 1. Питер Эгр (Peter Agre), Медицинская школа Университета Джона Хопкинса, Балтимор (США)

Молекулы воды, дойдя до середины канала, ориентируются так, что их дипольные моменты в верхней и нижней части канала направлены в противоположные стороны, что предотвращает проникновение через канал ионов. Аквапорин не пропускает даже ионы гидроксония H_3O^+ (то есть гидратированные протоны), от концентрации которых зависит кислотность среды. Такая модель аквапорина была названа «песочными часами» [19]. Отверстия проводящего воду канала воронкообразно расширены во внутриклеточное и внеклеточное пространство. Воронки постепенно переходят в самое узкое место канала, по которому селективно двигаются диполи воды. Узкий тоннель на большем своем протяжении гидрофобен [30]. Диаметр канала здесь суживается до 2,8 Ангстрема, т.е. соответствует среднему Ван – дер – Ваальсовскому диаметру молекулы воды.

Удивляют и скоростные показатели прохождения воды по этим каналам, так один аквапорин-1 может пропустить через себя примерно $3 \cdot 10^9$ молекул воды в секунду, это значительно превышает скорости описанных ионных каналов [32].

После установления структуры открытых каналов

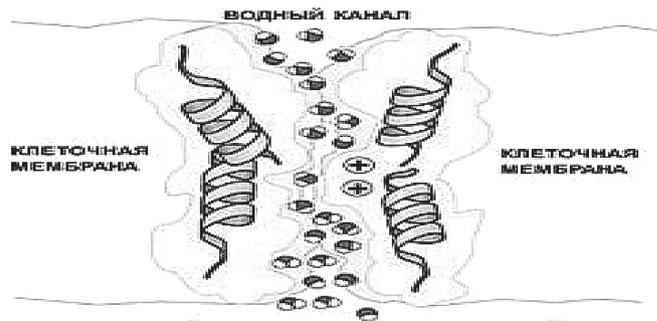


Рис. 2. В центре водного канала, образованного белком аквапорином, сосредоточен положительный заряд, поэтому положительно заряженные ионы через канал пройти не могут.

стал понятен описанный ранее эффект обратимого ингибирования транспорта воды соединениями ртути. Тиольные группы цистеина в структуре аквапорина является точкой взаимодействия с соединениями ртути. В результате этого взаимодействия возникают меркапидные ковалентные связи с остатком цистеина, в результате чего происходит инактивация аквапорина. Восстановить активность аквапорина удается при разрыве ковалентной связи, что приводит к освобождению тиольной группы [4].

В 2003 году Питеру Эгру вместе с Р. Маккинном присуждена Нобелевская премия «за открытия, связанные с ионными каналами в клеточных мембранах: за открытие водных каналов».

В настоящее время, учитывая водную селективность, все аквапорины условно делят на две подгруппы. К первой отнесены аквапорины, пропускающие только воду (собственно аквапорины). Сюда входят AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 и AQP8 [23]. Хотя AQP6 и AQP8 селективны не только к воде, но и к некоторым анионам, хлоридам и мочеvine при низких значениях pH [1], они схожи по строению с остальными представителями этой группы и поэтому отнесены к ней.

Вторую подгруппу составляют AQP3, AQP7, AQP9 и AQP10 способные пропускать не только воду, но и глицерин. Они получили название – акваглицеропорины [4].

При изучении локализации аквапоринов в клетках выявлено, что последние могут локализоваться как в апикальной, так в базальной и латеральной областях клеточной мембраны, причем в различных сочетаниях, состоящих как из аквапоринов, так и из акваглицеропоринов.

Аквапорины органов брюшной полости.

При исследовании органов пищеварения, основной функцией которых является перенос воды и питательных веществ из окружающей нас среды в организм, было выделено восемь изоформ аквапоринов: AQP1, AQP3, AQP4, AQP5, AQP8, AQP9, AQP10 и AQP12. Доказано, что ведущая роль во всасывании воды принадлежит именно аквапорином [4]. С помощью иммуногистохимии AQP1 обнаружен в эндотелии капилляров и других мелких сосудов, в лимфатических сосудах, в эпителии ворсинок кишечника. Установлено, что этот канал обеспечивает перенос воды через клеточные структуры и транспорт по лимфатическим сосудам хиломикронов, образующихся в кишечнике в процессе пищеварения [4, 25].

Однако наш обзор посвящен AQP1, широко представленному в эндотелии капилляров брюшины и в клетках мезотелия человека [22].

Понимание процессов, происходящих в свободной брюшной полости, имеет огромное значение для клинической медицины. Они интересуют не только хирургов при выполнении экстренных операций, но и онкологов, химиотерапевтов, нефрологов. Так как именно здесь разыгрываются катастрофы при воспалительных процессах и травмах, а успех их лечения зависит от скорости подавления патогенной микрофлоры, прекращения воспаления на всей поверхности брюшины (площадью около 2,2 м²) и восстановления перистальтики [2]. Здесь

идет распространение опухолевых процессов и имеет возможность использования этой полости для региональной химиотерапии. Введение химиотерапевтических препаратов в свободную брюшную полость преследует цель максимально воздействовать на пораженные органы и ткани. Чаще всего этот метод применяют при раке яичников, метастатическом поражении кишечника при колоректальном раке. Противоопухолевые препараты смешиваются с 2-3 литрами растворителя и капельно вводят в брюшную полость с учетом сохранности функции почек. Такая терапия позволяет использовать максимальные концентрации действующего вещества, избегая выраженной системной токсичности [5, 26].

Учитывая большую площадь поверхности брюшины, способной транспортировать жидкости, перитонеальный диализ (ПД) спасает жизнь тысячам пациентам, ожидающим пересадку почки. Более 30000 пациентов в США с терминальной стадией заболеваний почек ежегодно подвергаются перитонеальному диализу, а по данным мировой статистики более 15% больных с терминальной стадией ХПН во всем мире с успехом используют эту методику [15, 16].

В 1979 году, когда перитонеальный диализ только начинал внедряться в клиническую практику, известный исследователь в области гемодиализа Шеллман назвал его «лечением второго сорта для врачей второго сорта». Жизнь полностью опровергла его утверждение.

ПД относится к интракорпоральным методам очищения организма человека. Основной движущей силой, так же как и в гемодиализе, является градиент концентраций. Она достигается введением в брюшную полость раствора солей и глюкозы (диализата). Одновременно в организм могут быть введены полезные вещества путем создания более высокой концентрации их в диализате. Транспорт небольших веществ с молекулярной массой менее 1000 Да происходит главным образом путем диффузии из крови, через субперитонеальное микрососудистое русло. Конвективный перенос растворенных веществ является вторым механизмом чрезбрюшинного транспорта и имеет значение для макромолекул. Открытие семейства аквапоринов пролило новый свет на механизм ультрафильтрации воды. Следует отметить, что многие вещества, введенные в брюшную полость, переходят в плазму с той же скоростью, что и вещества введенные внутривенно [17].

В норме, брюшная полость является пространством, окружающим основные органы брюшной полости и малого таза. Выстилкой этой полости является брюшина, представленная одним слоем мезотелиальных клеток и несколькими слоями соединительной ткани. Принято считать, что брюшина состоит из пяти слоев соединительной ткани и слоя мезотелиальных клеток общей толщиной 90 мкм [17]. Мезотелий прикреплен к базальной мембране, состоящей из коллагена, гликопротеинов и протеогликанов и представляет собой селективный барьер, а также играет важную роль в регенерации брюшины. Подмембранное пространство соединительной ткани брюшины состоит из волокон коллагена и протеогликанов, представляющих собой своеобразное молекулярное сито, регулирующих процессы прохождения клеток, макромолекул и воды. Между тем отмече-

но, что кровеносные сосуды (капиллярное русло) залегают на глубине 40 мкм от поверхности брюшины. Мезотелиальные клетки играют основную роль в выделении смазки, состоящей в основном из фосфолипидов и гликозаминогликанов [14]. Этим обеспечивается увлажнение поверхности органов брюшной полости и уменьшение трения между висцеральной и париетальной брюшиной, что важно для моторики кишки. Мезотелий играет также важную защитную роль, т.к. реагирует практически на любую агрессию, даже на введение в брюшную полость стерильных растворов.

Однако, как показывают последние исследования, брюшина, имея сложную трехмерную структуру, не является барьером или мембраной в полном смысле этого слова. Исследования на грызунах и пациентах подвергшихся перитонеальному диализу показали, что белки, введенные в брюшную полость, исчезают из неё в 5-10 раз быстрее, чем появляются в крови [18]. Поскольку единственным маршрутом переноса белка из брюшной полости в кровоток принято считать лимфатическую систему [28], то этот факт означает, что существует другой механизм, ответственный за исчезновение белка из брюшной полости. Гистологические исследования тканей подопытных грызунов показали, что все белки, которые покинули брюшную полость, но не поступили в кровь, находились в толще брюшины. В последующих экспериментах было показано, что концентрация и скорость их транспортировки регулируются гидростатическим давлением. Скорость переноса белка количественно соответствовала скорости переноса изотонического раствора из брюшной полости, это указывает на то, что белок выступает в качестве маркера переноса жидкости из брюшной полости в окружающие ткани, а так же на то, что брюшина является слабым барьером для альбумина и иммуноглобулинов [18]. Кроме этого, полное удаление брюшины у экспериментальных животных практически не влияло на осмотическую фильтрацию жидкости из тканей в брюшную полость, как и не влияло на передачу малых растворенных веществ в ткани. Эти же данные подтверждаются в наблюдениях у пациентов, перенесших частичное или полное удаление брюшины как этап лечения карциноматоза [13]. На основании этих исследований можно сделать вывод о том, что анатомически брюшина не является существенным барьером на пути растворов низкомолекулярных веществ или макромолекул белков. Лимитирующим фактором на пути этих веществ становится стенка кровеносного сосуда и окружающий её интерстиций.

Открытие Эгра и его коллег дало толчок захватывающим исследованиям. Так в 1996 году Карлссоном [12] в экспериментах на животных впервые было показано, что торможение аквапорина-1 раствором сулемы при перитонеальном диализе приводит к значительному уменьшению объема осмотически фильтрующейся жидкости из тканей. Компьютерное моделирование перитонеального транспорта продемонстрировало, что 66% транспорта воды связано с аквапоринами. Эти выводы были подтверждены и на AQP-нулевых мышах. Когда эти животные были подвергнуты перитонеальному диализу с гипертоническим раствором, фильтрация у них составила 40% от группы контроля [31].

Введение гипертонического раствора во время нормального диализа приводит к уменьшению концентрации натрия в течение первых нескольких минут. Это убедительно показывает, что капиллярный барьер работает как совершенная полупроницаемая мембрана, которая позволяет воде свободно проходить через водные каналы без растворенных в ней веществ [20].

Между тем возникновение признаков острого перитонита резко нарушает работу этой мембраны. В работах, выполненных на крысах с моделированным острым перитонитом, было показано, что потеря ультрафильтрации связана не с уменьшением количества аквапорина-1, а с существенным увеличением общего оксида азота (NO) и изоформ NO-синтазы (в т.ч. эндотелиальной). То есть, изменение сосудистой проницаемости индуцируется NO. Это убедительно было продемонстрировано на животных, у которых в ходе острого перитонита с нарушенной ультрафильтрацией проводили ингибирование NO-синтазы, что приводило к значительному улучшению фильтрационных показателей брюшины [17].

Хотя наличие аквапоринов уже ни кем не оспаривается, между тем, в настоящее время активно изучается роль эндотелиального гликокаликса, как структуры определяющей проницаемость микрососудистой стенки. Эндотелиальный гликокаликс представляет собой полисахаридную выстилку сосудистой стенкой, лежащую от эндотелия к просвету сосуда. Она состоит из протеогликанов и гликопротеинов, связанных с клеточной мембраной и занимающей 10 – 20% сосудистого объема. Полагают, что проницаемость гликокаликса определяется гиалуронатом, а объем гликокаликса регулируется протеогликанами. Гликокаликс эндотелия рассматривается как защитный слой на сосудистой стенке против патогенного воздействия, транспортный сетевой барьер для трансэндотелиального передвижения молекул и как пористый гидродинамический партнер взаимодействия с эритроцитами и лейкоцитами в микрососудах [11, 24].

Исследования последних лет внесли некоторую ясность в процессы, происходящие в брюшной полости при перитонеальном диализе, между тем изучение содержания газов в перитонеальной жидкости экспериментальных животных привели к неожиданным результатам. Так прямое измерение парциального давления кислорода выявило, что содержание его в перитонеальной жидкости близко по значению либо выше, чем в капиллярной крови животного, что противоречит ортодоксальной диффузионной теории [3], согласно которой основной движущей силой является разница концентраций.

Обмен, происходящий через стенку капилляра, является важнейшим процессом жизнедеятельности организма. Одним из механизмов трансапикалярного обмена является доставка полезных веществ (в частности, кислорода) в ткани посредством фильтрации плазмы крови через поры в стенках капилляров. Фильтрационное течение и газообмен, в соответствии со схемой Старлинга и теорией Крюга обусловлены перепадом давлений и концентраций внутри и вне капилляра, которые выше на артериальном конце и ниже на венольном (с учетом онкотической составляющей). Разница

давлений, как и градиент давления в капилляр, в классической схеме Старлинга считается постоянной. Эта же теория предполагает, что кровь движется по капиллярному руслу с постоянной скоростью, интерстициальное пространство является неподвижной средой, а транспорт кислорода осуществляется по закону Фика. Однако данные последних экспериментов Института лазерной физики СО РАН [6,7,8] свидетельствуют о наличии локальных колебаний давления в капилляре, обусловленных сердечными сокращениями. Эти работы подтверждают теорию осциллирующего массопереноса воды с помощью аквапоринов, предполагающую быстрый перенос воды между кровью, интерстициальным пространством и клеточными водными компартаментами под влиянием систолического, диастолического, пульсового давления, частоты сердечных сокращений и некоторых других факторов [4]. Этот же осцилляторный механизм был положен в основу конвективной теории оксигенации тканей [29], которая позволяет объяснить высокое содержание кислорода в перитонеальной жидкости. Следует заметить, что предложенная схема не отрицает устоявшиеся понятия диффузионной теории, а лишь дополняет ее. Согласно этой теории движение воды из капилляра и обратно связано с изменениями пульсового гидростатического давления, т.е. вышедшая из микрососудистого русла вода деоксигенируется в интерстиции и возвращается обратно для оксигенации в кровяное русло, причем объем воды, вовлеченный в массоперенос кислорода, напрямую зависит от частоты пульса. Следовательно, оксигенацию может осуществить небольшой объем воды, колеблющийся между сосудом и окружающим его пространством, а так как основной поток воды перемещается по аквапоринам, то и значение оксигенации тканей будет зависеть от их количества (удельной плотности) и функциональной активности на клеточной мембране. В настоящее время экспериментальными работами доказана ведущая роль аквапоринов в транспорте углекислого газа, в зависимости от pH среды

AQP1 несет ответственность за 60% транспорта CO_2 через мембрану эритроцита [10, 27]. Экспериментальное доказательство транспорта O_2 с помощью аквапоринов еще ждет своей реализации.

Таким образом, наличие аквапорина-1 в мезотелии и эндотелии капилляров брюшины играет огромную биологическую роль. С помощью этих каналов поддерживается интенсивный водный обмен между кровеносным руслом и перитонеальной полостью, а учитывая газотранспортную их функцию, осуществляется активное участие в тканевом дыхании периферических гистоструктур, не содержащих тканевые оболочки. Возможно высокий стационарный уровень pO_2 в перитонеальной жидкости является и защитным механизмом, не позволяющим анаэробной микрофлоре, превалирующей в кишечнике вызывать воспалительные процессы. Обратимость воздействия на аквапорины, позволит в будущем разработать механизмы регулирования их активности и, тем самым, влиять как на течение обменных процессов, происходящих в брюшной полости, так и на течение воспалительных процессов, связанных с вовлечением брюшины.

Литература

1. Гоженко, А. И., Колиев В. И., Гоженко Е. А., Лебедева Т. Л. Аквапорины и их роль в транспорте воды в почках и кишечнике / *Клінічна та експериментальна патологія* Том 7, №3, 2008 стр 1 – 22.
2. Гостищев, В. К., Стручков И. В. Хирургическая инфекция. М: Медицина 1991; 560.
3. Пархач, Л. П. «Конвективный массоперенос кислорода в гистоструктурах и водных компартаментах тканей». Материалы канд. диссертации. Минск, 2006г.
4. Титовец, Э. П. Аквапорины человека и животных, фундаментальные и клинические аспекты / Э. П. Титовец // Минск, 2007. – 240с.
5. Alberts, DS, Liu PY, Hannigan EV, O'Toole R, Williams SD, Young JA, Franklin EW, Clarke-Pearson DL, Malviya VK, and DuBeshter B. Intraperitoneal cisplatin plus intravenous cyclophosphamide versus intravenous cisplatin plus intravenous cyclophosphamide for stage III ovarian cancer. *New Engl J Med* 335: 1950 – 1955, 1996.
6. Bagayev, S. N., Zakharov V. N., Orlov V. A., Panov S. V., Fomin Yu.N. Investigation of Physical Mechanisms of Blood Microcirculation and Transcapillary Exchange by Using the Phase Sensitive Laser Method // *Rus. J. Biomechanics*. 2006. V. 10, N 3. P. 21-38.
7. Bagayev, S. N., Zakharov V. N., Orlov V. A., Panov S. V., Ratushnyak A. S., Zapara T. A. Regulation of the Transcapillary Exchange by Pulse Pressure Blood // *Rus. J. Biomechanics*. 2008. V. 12, N3. P.7 – 14.
8. Bagayev, S. N., Fomin Yu. N., Orlov V. A., Panov S. V., Zakharov V. N., and Metyolkina M. G.. Investigation of Transcapillary Exchange by the Laser Method // *Laser Physics*. 2005. Vol. 15, No. 9. P. 1292 – 1298.
9. Borgnia, M. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels / M. Borgnia, S. Nielsen, A. Engel, P. Agre // *Annu. Rev. Biochem.* – 1999. – Vol.68. – P. 425 – 458.
10. Boron, W. Sharpey-Schafer Lecture: Gas channels // *Exp Physiol* December 1, 2010 95:1107-1130.
11. Cabrales, P, Vaézquez BY, Tsai AG et al. Microvascular and capillary perfusion following glycocalyx degradation. *J Appl Physiol* 2007;102: 2251 – 9.
12. Carlsson, O, Nielsen S, Zakaria ER, and Rippe B. In vivo inhibition of transcellular water channels (aquaporin-1) during acute peritoneal dialysis in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 271: H2254 – H2262, 1996.
13. De Lima Vazquez V, Stuart OA, Mohamed F, and Sugarbaker P. Extent of parietal peritonectomy does not change intraperitoneal chemotherapy pharmacokinetics. *Cancer Chemother Rep* 52: 108 – 112, 2003.
14. DeVriese AS, Tilton RG, Stephan CC, and Lameire N. Vascular endothelial growth factor is essential for hyperglycemia-induced structural and functional alterations of the peritoneal membrane. *J Am Soc Nephrol* 12: 1734 – 1741, 2001.
15. Devuyt, O., Ni J. Aquaporin-1 in the peritoneal membrane: Implications for water transport across capillaries and peritoneal dialysis // *Biochimica et Biophysica Acta* 1758 (2006) 1078 – 1084
16. Devuyt, O., Ni J., Verbavatz J. Aquaporin-1 in the peritoneal membrane: implications for peritoneal dialysis and endothelial cell function. *Biol. Cell* (2005) 97, 667 – 673
17. Flessner, M. F. The transport barrier in intraperitoneal therapy // *Am J Physiol Renal Physiol*, March 1, 2005; 288(3): F433 – F442
18. Flessner, MF, Lofthouse J, and Zakaria EL. Improving contact area between the peritoneum and intraperitoneal therapeutic solutions. *J Am Soc Nephrol* 12: 807 – 813, 2001.
19. Jung, J.S. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model / J.S. Jung, G.M. Preston, B.L. Smith [et al.] // *J. Biol. Chem.* 1994. – Vol. 269. – P.14648 – 14654.
20. Kone BC. Nitric oxide in renal health and disease. *Am J Kidney Dis* 30: 311 – 333, 1997.[Web of Science][Medline]
21. Kyama, Y. Molecular cloning of a new aquaporin from rat pan-

☆ **Обзоры и лекции**

creas and liver / Y. Kyama, T. Yamamoto, D. Kondo [et al.] // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol.272. – p. 30329 – 30333.

22. *Lai, K.N., Li F.K., Lan H.Y.* Expression of AQP1 in human peritoneal mesothelial cells and its upregulation by glucose in vitro // J. Am. Soc.Nephrol. – 2001. – Vol. 12. – P. 1036 – 1045.

23. *Landon, S. K., D. Kozono, P. Agre* From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology // Cell Biol. – 2004. – Vol. 5. – P. 687.

24. *Long, DS, Smith ML, Pries AR et al.* Microviscometry reveals reduced blood viscosity and altered shear rate and shear stress profiles in microvessels after hemodilution. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 10060 – 5.

25. *Ma, T.* Aquaporin water channels in gastrointestinal physiology / T. Ma, A.S. Verkman // J. Physiol. – 1999. – Vol. 517. – P. 317 – 326.

26. *Margetts PJ, Kolb M, Galt T, Hoff CM, Shockley TR, and Gauldie J.* Gene transfer of transforming growth factor-1 to the rat peritoneum: effects on membrane function. J Am Soc Nephrol 12: 2029 – 2039, 2001.

27. *Musa-Aziz, R., Chen L., Pelletier M., Boron W.* Relative CO₂/NH₃ selectivities of AQP1, AQP4, AQP5, AmtB, and RhAG // Proc. Natl. Acad. Sci. USA March 31, 2009 106:5406-5411.

28. *Rippe, B. and Haraldsson B.* Fluid and protein fluxes across small and large pores in the microvasculature. Application of two-pore equations. Acta Physiol Scand 131: 411 – 428, 1987.[Web of Science][Medline]

29. *Titovets, E. P., Stepanova T.S.* Mathematical model for convective mechanism of brain oxygenation and edema and its clinical implications// Proceed. of Intern. Conf. Adv. inform. and teled. technol. for health. – Minsk, 2005. – Vol. 1. – p.108 – 111.

30. *Weller, B.* Dystrophin-deficient mdx muscle fibers are preferentially vulnerable to necrosis induced by experimental lengthening contractions / B.Weller, G. Karpati, S. Carpenter // J. Neurol. Sci. – 1990. – Vol. 100. – P. 9-13.

31. *Yang, B, Folkesson HG, Yang J, Mattick LR, Ma T, and Verkman AS.* Reduced osmotic water permeability of the peritoneal barrier in aquaporin-1 knockout mice. Am J Physiol Cell Physiol 276: C76 – C81, 1999.

32. *Zeidel, M. L.* Ultrastructure, pharmacologic inhibition, and transport selectivity of aquaporins channel-forming integral protein in proteoliposomes /M. L. Zeidel, S. Nielsen, B. L. Smith [et al.] // Biochem. – 1994. – Vol. 33. – P.1606-1615.

Поступила 16.02.2012 г.