

Н. М. Кургалюк

Вплив модифікації продукції оксиду азоту L-NNA на стан системи антиоксидантного захисту і перекисного окиснення ліпідів у крові та тканинах щурів з різною резистентністю до гіпоксії

Проведены экспериментальные исследования по изучению влияния донора NO групп L-аргинина и блокатора синтазы оксида азота L-NNA при внутривенном введении на состояние системы антиоксидантной защиты – АОЗ – (активность супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и церулоплазмينا) и перекисного окисления липидов – ПОЛ – (содержание диеновых конъюгатов и малонового диальдегида) в крови и тканях крыс с высокой и низкой резистентностью к гипоксии в условиях стресса. Сдвиги в системе АОЗ и ПОЛ, вызванные введением L-аргинина в условиях острого стресса в крови и тканях «низкорезистентных» крыс могут быть фактором коррекции этих изменений до уровня «высокорезистентных» в контроле и не всегда нивелируются при введении L-NNA. Сделан вывод о целесообразности исследования влияния адапционных ответов животных с различной резистентностью к гипоксии в условиях моделирования патологических состояний, в частности стрессовых нагрузок, что более четко отражает физиологические ответы исследуемых показателей ПОЛ и АОЗ.

Вступ

Головним механізмом, який лежить в основі фазових змін функцій клітини на дію екстремальних чинників довкілля, є стан аеробної компоненти енергетичного обміну [4]. Встановлено, що резистентність до гіпоксії засвідчує стан активності мітохондріальних ферментних комплексів і виступає основним чинником тканинної гіпоксії [16]. Цей процес спричинено переважаючими впливами парасимпатичної (для «високорезистентних» особин) і симпатичної (для «низкорезистентних» відповідно) систем [5, 9, 10]. Стан енергозабезпечення за умов дії стресорних ушкоджень зумовлений активністю системи антиоксидантного захисту (АОЗ) і перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) [19] і виступає вирішальним фактором формування метаболічних змін у тварин з різною резистентністю до дії гіпоксичного та інших несприятливих чинників довкілля.

Згідно з сучасними дослідженнями оксид азоту розглядається як новий важливий фізіологічний регулятор функцій організму та метаболізму клітин, з яким пов'язане уявлення про нову стрес-лімітуючу систему [2, 11]. Дія цієї NO-ергічної системи заснована на здатності викликати активацію основних ланок стрес-реакції і підвищувати активність ендогенних захисних систем організму. Показано, що фізіологічна активація цієї ланки регуляції

© Н. М. Кургалюк

при введенні донорів оксиду азоту у багатьох випадках забезпечує ефективний захист від стресорних ушкоджень і підвищує адаптаційні можливості організму [18]. Однак у літературі недостатньо висвітлена роль тварин з високою та низькою резистентністю до гіпоксії (НР і ВР) реагувати на аналогічні стресорні ушкодження.

Метою нашого дослідження було порівняльне вивчення динаміки процесів активності системи АОЗ і ПОЛ у крові та тканинах щурів з різною резистентністю до гіпоксії за умов стресу і парентерального введення донора оксиду азоту L-аргініну та блокатора синтази оксиду азоту L-NNA.

Методика

Дослідження проведено на 48 щурах-самцях лінії Вістар масою 200–220 г, яких утримували на стандартній дієті. Щурів попередньо розділяли за їх резистентністю до гіпобаричної гіпоксії на тварин з НР і з ВР. Реакцію тварин на гостру гіпоксію оцінювали за часом їх перебування на «висоті» 12 000 м («підйом» у барокамері) до появи другого агонального вдиху або судом. У тварин з ВР він становив 7 хв і більше, у НР — до 2 хв.

Як метод стресування дослідних тварин використали екстремальний вплив, пов'язаний з вільним плаванням щурів у клітці, закритій сіткою, відстань від води до сітки була 5 см [1]. Температура води 22 °С. Час плавання — 30 хв. Тваринам з ВР і НР перед дослідом вводили внутрішньо-очеревинно 1 мл фізіологічного розчину, L-аргінін (600 мг/кг, фірми «Sigma», США) та блокатор синтази оксиду азоту N^ω-монометил L-аргінін L-NNA (35 мг/кг, фірми «Sigma», США). Час дії кожного препарату був 30 хв. Тварин декапітували одразу після плавання під ефірним наркозом.

Досліджували активність супероксиддисмутази (СОД) [8], каталази (КАТ) [7], глутатіонредуктази [13], глутатіонпероксидази [12], концентрацію дієнових кон'югатів [14], малонового діальдегіду (МДА) [3, 15] і церулоплазмину (ЦП) [6]. Результати досліджень обробляли статистично, використовуючи критерій t Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Одержані результати свідчать, що активність системи АОЗ і рівень процесів ПОЛ у тварин, які відрізняються за чутливістю до гіпоксії, вищий у контролі для тварин з ВР. Це може виступати резервним компенсаційним механізмом при дії несприятливих факторів довкілля і краще виражене у тварин з ВР (табл. 1 і 2).

Вибраний нами метод стресування у тварин [1] засвідчив значні порушення у системі АОЗ, яка складається зі структурно-функціональних ланок і забезпечує регуляцію інтенсивності вільнорадикальних реакцій. Складовою її частиною виступає система ферментів, які відповідають за інактивацію інтермедіатів кисню і вільних радикалів, а також ферментів, які беруть участь у розпаді гідроперекисів [4]. Встановлено, що стресорні навантаження для обох груп тварин викликають значне вірогідне підвищення активності СОД. Для тварин з ВР воно становило 236 % ($P < 0,01$), а з НР — 85,36 % ($P < 0,05$) щодо контрольних значень. Підвищувалася також активність ферменту КАТ, пов'язаного з метаболізмом перекису водню: для

Таблиця 1. Вплив L-аргініну і блокатора синтази оксиду азоту L-NNA на активність ферментів антиоксидантного захисту і процеси перекисного окиснення ліпідів у крові і тканинах щурів з високою резистентністю до гіпоксії за умов стресорних навантажень ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Контроль	Стрес	Вплив L-аргініну	Вплив L-NNA
Супероксиддисмутаза, од. акт./мг·хв	253,66±12,33	851,63±12,16*	830,63±22,46*	783,49±11,11*
Каталаза, мкмоль/хв·л	123,66±8,24	152,64±11,37*	120,80±9,36	142,80±9,16
Глутатіонредуктаза, мкмоль НАДФН ₂ /хв	64,27±3,18	18,31±1,61*	48,95±1,61*	46,86±3,44*
Глутатіонпероксидаза, мкмоль/хв	92,51±6,41	50,45±2,27*	79,45±6,33*	94,47±9,11
Церулоплазмін, мг%	16,68±0,71	18,44±1,22	22,47±1,32*	8,92±0,21*
Малоновий діальдегід кров, нмоль/л	2,16±0,04	17,84±0,29*	26,28±1,1*	24,78±0,47*
печінка, нмоль/г	2,34±0,06	2,42±0,31	2,67±0,63	2,23±0,08*
Дієнові кон'югати кров, ΔD_{233} /мл	28,11±1,32	49,11±2,83*	48,82±2,14*	48,46±0,93*
печінка, ΔD_{233} /г	34,27±1,85	26,67±1,38*	31,20±1,36*	27,83±2,12*

Примітка. Тут і в табл. 2 * вірогідні зміни відносно контролю ($P < 0,05$).

Таблиця 2. Вплив L-аргініну і блокатора синтази оксиду азоту L-NNA на активність ферментів антиоксидантного захисту і процеси перекисного окиснення ліпідів у крові та тканинах щурів з низькою резистентністю до гіпоксії ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Контроль	Стрес	Вплив L-аргініну	Вплив L-NNA
Супероксиддисмутаза, од. акт./мг·хв	205,50±21,14	380,36±14,6*	368,47±12,04*	606,69±10,04*
Каталаза, мкмоль/хв·л	136,57±11,01	213,57±11,81*	122,19±15,03	80,30±7,79*
Глутатіонредуктаза, мкмоль НАДФН ₂ /хв	53,54±4,7	18,65±1,81*	49,19±2,22	41,72±2,02
Глутатіонпероксидаза, мкмоль/хв	59,48±7,84	109,67±9,1*	66,25±3,47	82,66±2,27*
Церулоплазмін, мг%	17,52±0,67	15,45±0,56	20,48±1,33	21,50±1,16
Малоновий діальдегід кров, нмоль/л	2,73±0,17	14,33±0,61*	9,19±0,12*	16,69±0,71*
печінка, нмоль/г	2,44±0,08	2,51±0,09	2,04±0,03	3,24±0,20*
Дієнові кон'югати кров, ΔD_{233} /мл	19,84±0,10	58,17±0,76*	32,46±0,84*	46,28±1,42*
печінка, ΔD_{233} /г	34,35±1,91	35,66±1,96	33,68±1,91	25,00±1,51

щурів з ВР до дії гіпоксичного чинника вона підвищилася на 23,24 %, а з низькою — була значно вищою (на 56,38 %; $P < 0,05$). Поряд з цим встановлено вірогідне зниження активності глутатіонредуктази (ГР) в обох групах тварин і глутатіонпероксидази (ГП) лише для щурів з ВР за аналогічних

умов. Можливо, такі зміни доводять наявність системного механізму АОЗ через стан гемічного компоненту транспорту кисню і прооксидантно-антиоксидантною рівновагою вільнорадикального окиснення ліпідів, яка зумовлює регулюючий вплив парасимпатичної та симпатичної ланок регуляції у реалізації фізіологічних ефектів на гострий патологічний вплив.

З іншого боку відомо, що між ферментами системи АОЗ існують тонкі регуляторні взаємозв'язки, що і забезпечує високу специфічність і ефективну взаємодію [19]. Показано, що кількісне співвідношення каталази, перекисів і донорів водню у клітині зумовлює можливість для реалізації каталазної або пероксидазної функцій. Цей принцип визначає відмінність між тканинами: в еритроцитах переважає пероксидна функція, а у тканині печінки — каталазна. Тому різниця концентрації КАТ у різних тканинах при фізіологічних і патологічних станах визначає неоднозначність стаціонарної концентрації перекису водню за однакових умов його генерації. ГП каталізує реакції розпаду перекисів ширшого спектра, ніж КАТ, оскільки здатна відновлювати гідроперекиси жирних кислот, перекиси білкового та нуклеїнового походження і пов'язана з реакцією окиснення — відновлення глутатіону. Фермент є специфічним для відновленого глутатіону і значно залежить від донорів водню в клітині. Вплив КАТ особливо ефективний у разі високих концентрацій перекису водню, що генерується у пероксисомах. ГП здатна не тільки утилізувати гідроперекиси мембран, а й метаболізувати перекис водню у цитозолі і мітохондріях. Переважна компартменталізація КАТ у пероксисомах, а ГП у цитозолі і мітохондріях полегшує їх ефективну дію у метаболізмі перекису водню і забезпечує підтримання його концентрації у клітині у фізіологічних межах [4]. Відомо, що між СОД і КАТ існує певний синергізм, зазначений у низці досліджень, оскільки супероксидний аніон здатний інгібувати КАТ.

Наступним етапом нашого дослідження стало вивчення концентрації ЦП — мідьвмісного білка, який регулює вільнорадикальний метаболізм і має антиоксидантні властивості. Вони полягають у здатності до взаємодії з супероксидом і перекисом водню, що вносило навіть деяке непорозуміння при перших дослідженнях активності цих ферментів у крові. ЦП окиснює двовалентне залізо до тривалентного з паралельним відновленням кисню до води. Показано, що така ферментативна активність необхідна для зв'язування заліза з феритином і зумовлює оксидазні властивості крові. Зменшення концентрації ЦП викликає різке зниження синтезу гем у мітохондріях. Встановлено, що гострий стрес супроводжується підвищенням концентрації ЦП для тварин з ВР і зниженням його вмісту у щурів з НР. Можливо, такі ефекти спрямовані на підтримання компенсаторних механізмів і підвищення антиоксидантно-захисних функцій крові при напруженій життєдіяльності, викликаній значним збудженням симпато-адреналової системи, яка краще виражена у тварин з НР. Досліджуючи активність ПОЛ за вмістом ДК і МДА встановлено значне вірогідне нагромадження цих продуктів у крові й тканині печінки.

Отже, змодельовані стресорні навантаження у тварин викликають зміни активності АОЗ, пов'язані з переважним функціонуванням СОД і КАТ для щурів з ВР і ГП для тварин з НР.

Перспективність клінічних досліджень ефектів оксиду азоту при стресі за умов адаптації пов'язана з тим, що багато патологічних станів, які викликані ефектами гіпоксії, характеризуються зниженням потужності систем генерації оксиду азоту. Одночасно для шоку різного генезу характерна гіперпродукція NO, яка викликає порушення вазоконстрикторних відповідей [2, 17]. Тому використання адаптаційних методів, спрямованих на збалансування продукції NO в організмі, може виступати ефективним засобом попередження та лікування захворювань, пов'язаних з гіпо- та з гіперпродукцією NO [11].

Вплив L-аргініну за умов дії стресорних навантажень викликав значну активацію СОД, проте вірогідно не змінювався в обох групах тварин відносно значень у щурів, яким препарат не вводили. Зокрема, ферментативна активність, пов'язана з інактивацією супероксидного аніона дещо знижувалася для щурів з ВР і НР. Аналогічні зміни встановлено щодо активності КАТ у наших дослідженнях.

Дія попередника біосинтезу оксиду азоту в наших дослідженнях сприяла перемиканню функціонування системи АОЗ з СОД і КАТ на захисну антиокиснювальну систему глутатіону, активність якої вірогідно знижувалася за умов гострого стесорного впливу. Зокрема активність ГР у серії тварин з ВР підвищилася на 172,8 % і ГП на 57,48 % щодо значень показників у тварин, які зазнали стресорного впливу.

У групі щурів з НР підвищення активності ГР становило 163 %, проте активність ГП поверталася до вихідного рівня у інтактних щурів з НР. Отже, за стресорного впливу встановлено посилення ролі системи АОЗ глутатіону щодо СОД і КАТ у реалізації ефектів екзогенного L-аргініну для двох груп тварин.

Поряд з хімічною взаємодією оксиду азоту та супероксиду регуляторне значення має взаємовплив сигнальних механізмів NO і активних форм кисню (АФК). Зокрема гальмування функцій мітохондрій NO-залежними механізмами [16] призводить до збільшення утворення АФК. У результаті взаємодії NO з супероксидом зворотне інгібування мітохондріального дихання стає незворотним через внутрішньоклітинне утворення пероксинітриду. Для серцевого м'яза бика гіпоксія з наступною реоксигенацією викликає опосередковане пероксинітридом інгібування дихання. Пряме відношення до цього мають іони супероксиду, які утворюються в ендотелії судин під впливом циклооксигенази і ксантинооксидази. Значна роль відводиться за цих умов перекису водню, який викликає ендотелійзалежну і простагландинезалежну дилатацію аорти кролика. Цей механізм зумовлений збільшенням під впливом перекису вмісту клітинного кальцію, який може брати участь у стимуляції NOS. Крім того, NO може інгібувати КАТ і її участь у пероксидзалежній стимуляції розчинної ГЦ. Взаємодія сигнальних систем NO і АФК залежать від фізіологічних концентрацій, необхідних для прояву ефектів на клітинному рівні [2, 11].

Відомо, що NO виступає потужним перехоплювачем супероксиду, оскільки у концентраціях, які відповідають вмісту СОД у тканині, може успішно конкурувати з останньою, перехоплюючи до 50 % супероксиду. Отже, зі збільшенням наномолярного вмісту NO функціонує як ефективна пастка

супероксиду, змінюючи АОЗ сигнальні механізми на альтернативні, що активуються NO. Можливо, ці ефекти опосередковують дію блокатора синтази NO L-NNA, який спричинює вірогідне підвищення активності СОД у групі щурів з НР і КАТ для тварин з ВР за умов стресу.

Вплив донора оксиду азоту за цих умов призводив до нагромадження ЦП у двох групах щурів, однак був вищим у тварин з ВР. У той самий час вплив блокатора NOS для першої групи тварин значно знижував концентрацію ЦП (вдвічі нижче від вихідного вмісту інтактних тварин з ВР). Для щурів з НР ефект дії блокатора реалізувався через збільшення вмісту ЦП. Отже, оксидазні властивості крові значною мірою зумовлені функціонуванням NO-ергічних механізмів і можуть коригуватися введенням блокаторів синтази оксиду азоту. Це може виступати одним з основних способів формування адаптаційних механізмів у разі дії екстремальних факторів довкілля, пов'язаних з функціонуванням залізовмісних білків крові.

Процеси ПОЛ, які ми оцінювали за нагромадженням у крові і тканині печінки первинних продуктів (ДК) і вторинних продуктів (МДА) засвідчують разке вірогідне підвищення вмісту обох форм за умов дії стресорного навантаження. Однак введення L-аргініну має деякі особливості та значно залежить від резистентності до гіпоксії. Зокрема, для тварин з ВР воно викликає підвищення концентрації процесів ПОЛ і дещо знижується за умов парентерального введення блокатора синтази оксиду азоту L-NNA. У серії досліджень на щурах з НР встановлено зниження вмісту ДК і МДА при активації NO-ергічних механізмів і відновлення за умов дії блокатора цього ферменту. Отже, за умов дії стресорних навантажень ефективнішим є використання донорів оксиду азоту для обмеження процесів ліпероксидації для тварин з НР, а для тварин з ВР коригування цих процесів здійснюється при обмеженні ефектів оксиду азоту та введенні блокаторів NOS.

Таким чином, проведені дослідження NO-залежних механізмів, пов'язаних з резистентністю до дії гіпоксичного чинника на систему АОЗ і ПОЛ, засвідчують існування фізіологічних регуляторних впливів, які сприяють фармакологічній корекції цих процесів і повинні враховуватися за умов дії екстремальних впливів довкілля.

Дослідження проведені за підтримки Західно-Українського біомедичного дослідного центру.

N. M. Kurhalyuk

INFLUENCE OF L-ARGININE AND BLOCKATOR NITRIC OXIDE SYNTHASE L-NNA ON ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITY, LIPID PEROXIDATION IN BLOOD AND TISSUES OF RATS WITH DIFFERENT RESISTANCE TO HYPOXIA UNDER STRESS CONDITIONS

The main components of antioxidant enzyme system (AOS) are superoxid dismutase (SOD) and glutathione reductase (GR) catalyses the conversion of the superoxide anion. The important role in AOS belongs to catalase and glutathione peroxidase which perform H_2O_2 to nontoxic products. Simultaneous determination of AOS activity and malonic dialdehyde (MDA) concentration (the index of lipid peroxidation in tissues and blood) characterize cells complex resistance to damage factor. The

effect of L-arginine, as a precursor of nitric oxide synthesis and blocator NO-synthase (Nw-nitro-L-arginine) on AOS of rats with different resistance to hypoxia under stress condition is unknown and were subject of our investigation. Experiments were done on liver and blood tissues of white laboratory rats. The experimental animals were divided on two groups depending on hypoxia factor: high resistance (HR) and low resistance (LR). The type of resistance was determined by the time of ability to respire in barocamera with oxygen deficient equal to 12.000 meters over sea level. The animals adaptation to laboratory conditions continue during 14 days after in barocamera presence. All animals were divided dependent on experiment conditions on fourth groups.

The first group: intact (HR and LR) animals parentherally injected by 1 ml of 0.9 % NaCl solution. The second group was subject of stress condition. The third group: HR and LR animals injected parentherally by 1 ml L-arginine (Sigma, USA) dose (600mg /kg body weight). The fourth one: rats injected by 1 ml Nw-nitro-L-arginine (L-NNA, Sigma, USA)- the blocator of NO-synthase. The animals were decapitated 30 min after injection and stress condition under ethereal anesthesia. Activity of antioxidant system enzymes superoxid dismutase (SOD), catalase (CAT); glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GP) were measured spectrophotometrically. Also was investigated the concentration of serum antioxidant ceruloplasmin (CP). Level of lipid peroxidation was estimate by examination of concentration of lipids of hydroperoxides (LHP) and malonic dialdehyde (MDA). Our data confirm suggesting that nitric oxide (NO) is a major regulator in the AOS enzymes activity and limit damage influence of AOF. Action precursor NO L-arginine might be capable of protective role in various disorders which are connected with hypoxia factor. Following thing can be interred the investigation of influence of nitric oxide adaptive answers in stress condition modelling of pathological processes in rats with different resistance to hypoxia and reflect the biological qualities data study on AOZ and LP.

*Ivan Franko Lviv National University
Ministry of Education*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Бондаренко О.Н., Бондаренко О.А., Манухина Е.Б.* Влияние различных методик стрессирования и адаптации на поведенческие и соматические показатели у крыс // БЭБиМ. — 1999. — **126**, №8. — С.157-160.
2. *Волин М.С., Дэвидсон К.А., Камински П.М. и др.* Механизмы передачи сигнала оксидант — оксид азота в сосудистой ткани // Биохимия. — 1998. — **63**, вып.7. — С. 958-965.
3. *Гаврилов В.Б., Гаврилова А.П., Мажуль Л.М.* Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой // Вопр. мед. химии, 1987. — **33**. — N1. — С.118-122.
4. *Герасимов А.М., Деленян Н.В., Шаов М.Т.* Формирование системы противокислородной защиты организма. — М., 1998. — 187с.
5. *Захарова Е.И. (Орлова), Лукьянова Л.Д., Иванов Д.С.* Сравнительная характеристика холинергических систем неокортекса и гиппокампа мозга крыс с низкой и высокой устойчивостью к гипоксии // БЭБиМ. — 1998. — **125**, №5. — С.521-525.
6. *Колб В.Г., Камышников В.С.* Справочник по клинической химии. — Минск.: Беларусь, 1982. — С.219-220.
7. *Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г.* Метод определения активности каталазы // Лаб.дело. — 1988. — №1. — С.16-19.
8. *Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.И.* Простой и чувствительный метод определения супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцитина // Вопр. мед. химии. — 1990. — №2. — С.88-91.

9. Кургалюк Н.М., Шостаковська І.В. Вплив α -кетоглутарату натрію на активність ферментів переамінування та сукцинатдегідрогенази у щурів з різною резистентністю до гіпоксії // Фізіол. журн. — 1999. — **45**, №6. — С.51-58.
10. Лукьянова Л.Д. Клеточные механизмы резистентности организма к гипоксии. — В кн.: Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция: Матер. Всерос. конф.(2-4 декабря 1997 г., Москва). — М., 1997. — С.74-75.
11. Мальшев И.Ю., Манухина Е.Б. Стресс, адаптация и оксид азота // Биохимия. — 1998. — **63**, вып.7. — С. 992-1006.
12. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. — 1986. — №12. — С.724-727.
13. Путьлина Ф.Е. Определение активности глутатионредуктазы // Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). — Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. — С.181-183.
14. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот. Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н.Ореховича. — М.: Медицина, 1977. — С.63-64.
15. Тимирбулатов Т.А., Селезнев С.И. Метод определения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // Лаб. дело. — 1988. — №4. — С.209-211.
16. Brown G. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase // FEBS Lett. — 1995. — **369**. — P.136-139.
17. Gross S., Wolin M. Nitric oxide: pathophysiological mechanism // Annu Rev. Physiol. — 1995. — **57**. — P. 737- 769.
18. Ingwall J., Kelly R. Nitric oxide, myocard oxygen consumption, and ATP synthesis // Circulat. Res. — 1998. — **83**. — P.1067-1068.
19. Michiels C., Raes M., Toussaint O., Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress // Free Radical Biology & Medicine. — 1994. — **17**, N3. — P.235-248.

Львів. нац. ун-т ім. Івана Франка
М-ва освіти України

Матеріал надійшов
до редакції 20.11.2000