

А.І. Березнякова, О.Д. Жемела

Здатність до деформації мембран еритроцитів у щурів різного віку при гіпоксії

Використовуючи сучасні та класичні методи вивчення осмотичної резистентності еритроцитів і білків мембрани червоних клітин крові встановлено, що здатність до деформації еритроцитів в умовах гемічної гіпоксії змінюється залежно від віку тварин: максимальна здатність спостерігається у щурят передпубертатного періоду (40,2 %), мінімальна – в групі старих щурів (19,7 %). Вікові зміни фізико-хімічних показників мембран еритроцитів полягають у збільшенні в'язкості ліпідного бішару (індекс мікров'язкості знижується у старих щурів порівняно з молодими статевозрілими тваринами на 69,5 %) і підвищенні вмісту скелетних білків (спектрину на 53,0 %), що є визначальним для зниження здатності еритроцитів деформації. Встановлено взаємозв'язок вікових змін деформації мембран еритроцитів і стану регіонарної мікроциркуляції: у старих щурів порівняно з молодими знижується об'єм перфузії на 43,8 %, об'єм фракції еритроцитів, які проходять в одиницю часу через мікросудини – на 59,3 %, індекс питомого поглинання кисню в тканинах на 6,6 %, а індекс перфузійного насичення киснем на 50,0 %.

Ключові слова: мембрана еритроцитів, гіпоксія, здатність до деформації.

ВСТУП

Гіпоксія – це унікальний патологічний процес, який супроводжує та визначає розвиток багатьох патологій. Незважаючи на явні відмінності пускових механізмів формування гіпоксії екзогенного та ендogenous походження, метаболічні зсуви в умовах нестачі кисню стереотипові [1, 15]. Вони пов'язані з енергодефіцитом і посиленням генерації активних форм кисню (АФК), які в подальшому призводять до мембранодеструкції, надлишкової ліпопероксидації, окисної модифікації білків, запуску запрограмованої смерті тощо [4]. Гіперпродукція АФК зумовлює порушення гомеостазу організму, пошкодження цитоскелета, деградацію мембранних фосfolіпідів [9]. Деструктивні процеси в мембранах еритроцитів призводять до порушення їх проникності, стійкості до кислотного гемолізу, розвитку аутогемолітичних процесів і виходу еритроцитарних ферментів у плазму крові [7].

Однією із найважливіших властивостей еритроцита є його здатність до деформації. Ця властивість допомагає йому під час проходження крізь капіляри не змінювати об'єму та площі поверхні. Здатність еритроцитів до деформації має важливе значення для підтримки оптимальних процесів дифузії газів в усьому мікроциркуляторному руслі різних органів. При цьому велике значення для цієї характеристики еритроцитів мають в'язкоеластичні властивості мембрани, які визначають стан спектринно-активного комплексу та його взаємодію з іншими структурними елементами мембрани [2, 3, 17]. Підмембранна сітка, яка складається з довгих та відносно гнучких ниток білка спектрину й актину, забезпечує стійкість мембрани, а розчин гемоглобіну (вміст цитоплазми, який подібний до рідини), не перешкоджаючи деформації [12]. З віком деформація еритроцитів у нормальних фізіологічних умовах зменшується, збільшується їх здатність до агрегації, знижується функція дихання, що,

за даними деяких авторів [10], впливає на стан системи мікроциркуляції. Останнім часом широко обговорюються механізми деформації еритроцитів, оскільки кров чутливо реагує на зміни будь-якого метаболічного процесу в організмі: еритроцити першими відповідають порушенням здатності до деформації своєї мембрани під впливом факторів зовнішнього та внутрішнього середовища [7], особливо під впливом ксенобіотиків різної природи, насамперед нітритів. Проникаючи через мембрану еритроцитів, вони викликають метгемоглобінемію, яка супроводжується розвитком гемічної та гістотоксичної гіпоксії [13]. Нітри-ти ініціюють процеси вільнорадикального окиснення із залученням білкових і ліпідних компонентів клітинних мембран [5, 9].

Мета роботи – вивчити морфофункціональний стан мембран еритроцитів та їх здатність до деформації у щурів різного віку при гіпоксії.

МЕТОДИКА

Експерименти проведені на білих нелінійних щурах-самцях різного віку. 1-ша група – щурята передпубертатного періоду масою 50–60 г, 2-га – молоді щури масою 100–120 г, 3-тя група – зрілі тварини масою 200–220 г та 4-та – старі щури масою 350–400 г. Досліджували кров та еритроцити щурів різних вікових груп. Тварин утримували в умовах раціону віварію. Забір крові проводили пункцією хвостової вени через 10–12 год після останнього прийому їжі. Як антикоагулянт використовували K_2EDTA у дозах, розрахованих для різних вікових груп за Риболовцевим [11] (6,17, 11,31, 20,57, 36,0 мг). Еритроцити відмивали розчином низької іонної сили Liss (виробник ТОВ «Гематолог») і розводили у співвідношення 1:2000.

Здатність деформації еритроцитарної мембрани визначали за методикою «лазерний пінцет» [8] за допомогою вимірювання відносного подовження еритроцитів під впливом лазерного пучка з довжиною хвилі опромінювання 1,08 мкм та максимальною

вихідною потужністю близько 200 мВт. Обрана довжина хвилі давала змогу потрапити в смугу прозорості еритроцитів і мінімізувати негативний вплив випромінювання на об'єкт. Швидкість пересування плями оптичної пастки становила 15–20 мкм/с. Пучок від лазера проходив через коліматор і спрямовувався в об'єкти мікроскопа МІН-8 (збільшення в 100 разів). Результати експериментів фіксували на ПМЗ-камеру, підключену до комп'ютера. Розмір еритроцитів визначали за тіньовим контуром, їхню деформацію – за допомогою програми контурного аналізу клітин.

Мікров'язкість мембран досліджували на спектрофлуориметрі «СМ-22» (Білорусь) за флуоресценцією зонда пірену [2]. Індекс мікров'язкості мембран розраховували як співвідношення флуоресценції пірену при довжині хвилі 480 і 390 нм [6, 14]. Осмотичну резистентність еритроцитів визначали за допомогою модифікованого методу Петрова (1985) з використанням антибіотика амфотерицину Б (АМТБ). Проби інкубували протягом 15 хв при 37°C, потім центрифугували при 3000 об/хв 5 хв, в супернатанті визначали концентрацію гемоглобіну при довжині хвилі 540 нм, розраховували відсоток гемолізованих еритроцитів.

Для проведення досліджень білків мембрани еритроцитів відмивку тіней червоних клітин крові здійснювали за методом Tannert [16]. Електрофорез білків мембран проводили в присутності додецилсульфату натрію (ДДС-Na) в градієнті щільності поліакриамідного гелю від 13,5 до 5 % упродовж 5,5 год. Гелі фарбували КумассіG 250 бриліантовим блакитним, вимочуючи протягом 12 год в розчині барвника-фіксатора, що містив 45 % метанолу і 25 % оцтової кислоти; диференціювали 10%-ю оцтовою кислотою та денситометрували («DM 2120»; Білорусь). Кількісно оцінювали вміст окремих білкових фракцій методом зважування піків. Гемічну гіпоксію викликали внутрішньоочеревинним введенням нітриту натрію в дозі 5 мг/100 г [13].

Усі дослідження проводили згідно з національними «Загальноетичними принципами

експериментів на тваринах» (Україна, 2011), узгодженими з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та схваленими I Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Усі маніпуляції, які викликали біль, проводили під барбаміловим наркозом [13].

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою пакета програм Statistica for Windows 6.0 з використанням критерію t Стьюдента та кореляційного аналізу. Результати вважали дійсними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що еритроцити, які здатні до деформації понад 40 % від початкового діаметра, значно ефективніше беруть участь у газообміні та не погіршують реологічні властивості крові (плинність, в'язкість), що дало змогу нам вважати еритроцити, котрі збільшують свій діаметр понад 40 % при їх деформації в лазерній пастці вважати «еластичними», а ті, що не мають подібного ефекту – «ригідними». Аналіз отриманих результатів показав, що з віком у щурів знижується ступінь деформації мембран еритроцитів. Так, у щурів усіх груп до 90 % від свого початкового діаметра при деформації змінювали свій діаметр 88,0; 84,5; 65,7 і 50,2 % клітин відповідно. Водночас паралельно зі збільшенням віку тварин у пробах крові підвищувалася кількість більш «ригідних» еритроцитів. Наприклад, кількість червоних клітин, які давали приріст діаметра до 40 % від початкового, збільшувалася і становила 12,0; 15,5; 34,3 і 49,8 % відповідно для 1–4 груп, а тих, що дають збільшення до 50 % – від 5,2 до 19,6 %. Таким чином, у периферичній крові щурів містяться еритроцити з різною здатністю до деформації. Зі збільшенням віку тварин знижується ступінь деформації мембран еритроцитів.

Як видно з табл. 1, у тварин 1-ї групи зафіксовані найбільш низькі значення індексу перфузійного насичення киснем в мікрокро-

вотоці – 4,8 ум. од., що свідчать про активне засвоєння кисню з їхньої перфузійної крові. Це підтверджується високими значеннями індексу питомого споживання кисню тканинами – 1,28 ум. од. та перфузії (M) і відносного об'єму фракції еритроцитів, що проходять через мікросудини (Vr).

Аналогічні показники відмічені нами і у щурів 2-ї групи. На відміну від них у дорослих тварин 3-ї групи виявлено значне (на 21,2 %, $P < 0,05$) зниження середнього рівня перфузії. При цьому достовірно зменшувався об'єм фракції еритроцитів, які проходили через мікросудини (на 35,0 %, $P < 0,05$). Ці зміни супроводжувалися зниженням ефективності газообміну у цієї групи щурів: на 24,5 % ($P < 0,05$) збільшувався індекс перфузійного насичення киснем у мікрокровотоці і на 3,3 % ($P < 0,05$) знижувався індекс питомого споживання кисню у тканинах. У щурів 4-ї групи об'єм перфузії зменшувався порівняно з показниками 1 та 2-ї груп на 43,8 % ($P < 0,05$), об'єм фракції еритроцитів, які проходили через мікросудини, на 59,3 %, а індекс питомого споживання кисню в тканинах на 6,6 % ($P < 0,05$). При цьому, так само як і у тварин 3-ї групи, у них збільшувався індекс перфузійного насичення кисню в мікрокровотоці на 50,0 % ($P < 0,05$).

Методом ЛФД було встановлено, що у щурів, зі старінням, особливо 4-ї групи була значно підвищена (на 21,9 %, $P < 0,05$) порівняно з 1-ю групою «червона» ендогенна флуоресценція при $\lambda = 600\text{--}800$ нм ($\lambda = 630$ нм), що відповідає ендогенним порфіринам та/або їх комплексам з білками. Деякий внесок у сумарний сигнал ендогенної флуоресценції можуть робити також і ліпофусцини, які мають у цій ділянці тривалий «шлейф» спектра люмінесценції. Ліпофусцин часто вважають індикатором старіння клітин організму людини. Крім того, як порфірини, так і ліпофусцин є маркерами наявності хронічної гіпоксії. Отримані результати свідчать, що зміни структурно-функціональних властивостей еритроцитів можуть мати важливе значення

Таблиця 1. Стан периферичної мікроциркуляції у щурів різних вікових груп при гіпоксії ($M \pm m$, $n=10$)

Показники	Групи			
	1-ша, щурята передпубертатного періоду	2-га, молоді щури	3-тя, зрілі щури	4-га, старі щури
Середнє значення перфузії (M), перф. од.	16,1±0,5	16,0±0,6	13,2±0,4*	11,2±0,4**
Насиченість киснем артеріальної крові (SO ₂), %	77,6±1,1	78,3±1,2	80,2±1,3	80,6±1,4
Насиченість киснем венозної крові (SpO ₂), %	99,9±0,1	99,8±0,2	98,3±0,1	97,1±0,1
Відносний об'єм фракції еритроцитів (Vr), %	19,6±0,3	19,3±0,4	14,3±0,3**	12,3±0,3**
Індекс перфузійного насичення киснем в мікрокровотоці (SOM=SO ₂ /M), ум.од.	4,8±0,1	4,9±0,3	6,1±0,1*	7,2±0,1**
Індекс питомого споживання кисню в тканині (U=SpO ₂ /SO ₂), ум.од.	1,28±0,01	1,27±0,02	1,23±0,02*	1,20±0,01*
Показник шунтування, ум.од.	1,3±0,1	1,5±0,1	1,9±0,2	2,3±0,2

*P < 0,05 порівняно з показниками 1–2-ї групи; **P < 0,05 – 1–3-ї групи.

в транспорті газів і є одним із факторів, що впливають на газообмін на рівні мікрогемодинаміки в залежності від віку.

Відома залежність здатності до деформування еритроцитів від в'язкості цитоплазми та стану мембрани. Про стан в'язкості ліпідного бішару судили за змінами індексу мікров'язкості, що визначали за допомогою ліпідного зонда пірену:

1-ша група	0,88±0,02 ум.од.
2-га група	0,84±0,03 ум.од.
3-тя група	0,62±0,01* ум.од.
4-та група	0,52±0,02* ум.од.

*P < 0,05 порівняно з 1-ю групою.

Було зареєстровано достовірне (P<0,05) зменшення індексу мікров'язкості мембран еритроцитів, що корелює (r=0,97) з віком щурів та динамікою зниження здатності деформування червоних клітин крові. Слід зазначити, що статистично значиме зниження мікров'язкості ліпідів мембран еритроцитів відбувалося саме у групі 3 – на 35,5 % (P<0,0001), а в групі 4 – це зниження становило 19,2 % (P<0,05).

Як додатковий критерій стану ліпідного бішару визначали ступінь гіпотонічного

гемолізу еритроцитів за наявності антибіотика АМТБ. Останній викликав достовірно (P<0,05) більший ступінь гемолізу еритроцитів у 3-й і 4-й групах тварин порівняно з 1-ю:

1-ша група	16,9±0,2 %
2-га група	24,3±0,1 %
3-тя група	49,9±0,3 %
4-та група	62,2±0,7* %

*P < 0,05 порівняно з 1-ю групою.

Між чутливістю еритроцитів до АМТБ і індексом мікров'язкості встановлений негативний кореляційний зв'язок (r=-0,94), тобто чим більша мікров'язкість ліпідного бішару, тим нижча осмотична резистентність.

Крім ліпідної складової, нами було вивчено вікові кількісні зміни білкової складової мембран еритроцитів. Результати дослідження наведені в табл. 2.

Відносний вміст високомолекулярних скелетних білків спектринів (фракція 13) в 2-й віковій групі статистично не відрізнявся від 1-ї. Достовірне підвищення вмісту на 20,5 % (P<0,05) порівняно зі щурами 1-ї групи було відмічено у тварин 3-ї групи, у тварин 4-ї групи порів-

Таблиця 2. Вміст білків у мембранах еритроцитів у щурів різного віку при гіпоксії (M±m, n=10)

Групи	Вміст білкових фракцій у мембранах еритроцитів, %			
	глутатіон-S-трансфераза	гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа	актин	спектрин
1-ша	4,26±0,1	4,36±0,2	8,45±0,2	24,61±0,5
2-га	4,11±0,3	3,81±0,2	8,43±0,3	25,35±0,4
3-тя	2,32±0,1*	2,75±0,5*	8,36±0,6	29,65±0,8*
4-та	1,32±0,3*	2,37±0,2*	6,34±0,6*	38,13±0,6*

няно зі щурами 1-ї та 2-ї груп це збільшення було в середньому 52,7 % (P<0,05). Відносний вміст білкових фракцій з молекулярною масою менше, ніж 50 кДа у щурів 3-ї та 4-ї груп, навпаки, знижувався. Так, зниження вмісту гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази, важливого ферменту енергетичного обміну еритроцитів, у 1,6 і 1,8 раза (P<0,05) у щурів 3- та 4-ї груп відповідно порівняно з показниками 1-ї групи може порушити енергетичний обмін еритроцитів. Аналогічно знижувався вміст ферменту глутатіон-S-трансферази. Непряме підтвердження цього – збільшення відсотка гемолізованих еритроцитів за наявності АМТБ. Вміст актину був достовірно зниженим (P<0,05) тільки у щурів 4-ї групи. Одночасне зниження вмісту білкових фракцій з відносно низькою молекулярною масою та локалізованих на внутрішньому боці мембрани еритроцитів може бути однією з причин структурно-функціональних вікових змін мембран червоних клітин крові.

Таким чином, отримані результати свідчать, що при старінні зменшується здатність мембран еритроцитів до деформації, що викликається збільшенням їхньої в'язкості, зниженням осмотичної резистентності на тлі збільшення вмісту високомолекулярних білків спектринів і зменшення низькомолекулярних білків цитоскелета та порушення білково-ліпідних взаємозв'язків.

ВИСНОВКИ

1. Здатність еритроцитів до деформації в умовах гемічної гіпоксії змінюється в залежності від віку тварин: максимальна спостерігається

у щурят предпубертатного періоду (40,2 %), мінімальна – в групі старих щурів (19,7 %).

2. Вікові зміни мембран еритроцитів в умовах гемічної гіпоксії полягають у збільшенні в'язкості ліпідного бішару (індекс мікров'язкості знижується у старих щурів порівняно з молодими статевозрілими тваринами на 69,5 %) і підвищенні відсотка скелетних білків (спектрину на 53,0 %), що визначає зниження здатності еритроцитів до деформації.

3. Встановлено взаємозв'язок вікових змін здатності мембран еритроцитів до деформації та стану регіональної мікроциркуляції: у старих щурів порівняно з молодими знижується об'єм перфузії на 43,8 %, об'єм фракції еритроцитів, які проходять в одиницю часу через мікросудини, на 59,3 %, індекс питомого поглинання кисню в тканинах на 6,6%, а індекс перфузійного насичення киснем на 50,0 %.

А. И. Березнякова, О.Д. Жемела

СПОСОБНОСТЬ К ДЕФОРМАЦИИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ У КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ

Используя современные и классические методы изучения осмотической резистентности эритроцитов и белков мембраны красных кровяных клеток установлено, что деформируемость эритроцитов в условиях гемической гипоксии изменяется в зависимости от возраста животных: максимальная способность наблюдается у крысят предпубертатного периода (40,2 %), минимальная – в группе старых крыс (19,7 %). Возрастные изменения мембран эритроцитов в условиях гипоксии заключаются в увеличении вязкости липидного бислоя (индекс микровязкости снижается у старых крыс в сравнении с молодыми половозрелыми животными на 69,5 %) и повышении процентного содержания скелетных белков (спектрин на 53,0 %), что определяет снижение деформируемости

эритроцитов с возрастом. Установлена взаимосвязь возрастных изменений деформируемости мембран эритроцитов и состояния регионарной микроциркуляции: у старых крыс в сравнении с молодыми снижается объем перфузии на 43,8 %, объем фракции эритроцитов, проходящих в единицу времени через микрососуды, на 59,3 %, индекс удельного потребления кислорода в тканях на 6,6%, а индекс перфузионного насыщения кислорода на 50,0 %.

Ключевые слова: мембрана эритроцитов, гипоксия, способность к деформации.

A. I. Bereznyakova, O.D. Jemela

DEFORMABILITY OF THE ERYTHROCYTES MEMBRANE IN RATS OF DIFFERENT AGE IN HYPOXIA

Using modern ("laser tweezers", low ionic strength Liss, definition of microviscosity of erythrocyte membranes by fluorescence probe pyrene) and classical methods of investigation the osmotic resistance of red blood cells and protein membrane of red blood cells, the authors have established that deformation of the red blood cells in hemic hypoxia varies depending on the animals' age. The maximum capacity of red blood cells to deform was detected in rats of prepubertal period (40.2%). In the group of old rats this parameter reached the minimum level (19.7%). Age changes in erythrocyte membranes during hypoxia are manifested in an increase in the viscosity of the lipid bilayer (microviscosity index reduced in old rats compared with young adult animals by 69.5%) and an increase in the percentage of skeletal protein spectrin (by 53.0%). These changes determine the reduction in deformation capacity of red blood cells. The relationship between the age-related changes of erythrocyte membrane deformation and the state of regional microcirculation has been determined. In old rats a perfusion volume is reduced by 43.8%, the fractional volume of red blood cells passing per unit time through microvessels reduced by 59.3%, the proportion of oxygen consumption in tissues decreased by 6.6% and the perfusion of oxygen saturation decreased by 50.0%.

Key words: the membrane of red blood cells, hypoxia, deformability.

National Pharmaceutical University, Kharkiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Архипенко Ю.В., Сазонова Т.Г. Патофизиологические аспекты новых форм адаптации к гипоксии // Кліні. та експерим. патологія. – 2004. – 3, № 2. – С. 94.
- Белкин А.В., Марьянских В.В. Исследование вязкоэластических свойств мембран эритроцитов крыс с различным уровнем двигательной активности и их реакция на стрессы различной этиологии // Вестн.

Нац. фармацевт. ун-т, Харків
E-mail: patology@ukrfa.kharkov.ua

- Тюмен. гос. ун-та. – 2007. – № 3. – С. 234–239.
- Бобынцева О.В. Количественное содержание липидов и белков клеточных мембран эритроцитов и их корреляционные взаимосвязи у человека : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Курск, 2006. – 163 с.
- Владимиров Ю.А. Биологические мембраны и незапрограммированная смерть клеток // Соросов. образоват. журн. Биология. – 2000. – № 9. – С. 2–9.
- Горис А.П. Морфофункциональные особенности эритроцитов у лиц различных возрастных групп : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Ульяновск, 2012. – 16 с.
- Добрецов Г.Е. Физико-химические исследования компонентов крови с помощью специальных флуоресцентных зондов // Вестн. Рос. академии мед. наук. – 2009. – № 10. – С. 15–19.
- Коркушко О. В., Иванов Л. А., Шатило В. Б. Особенности тканевого кислородного обмена и окислительных процессов у долгожителей // Успехи геронтологии. – 2012. – № 2. – С. 255–266.
- Коробцов А.В., Котова С.П., Лосевский Н.Н. Применение лазерного пинцета для изучения механических свойств эритроцитов // Известия Самар. науч. центра Рос. академии наук. – 2009. – 11, № 3. – С. 76–81.
- Лесникова Л.Н. Стрессорные изменения физиологических свойств эритроцитов и их коррекция с помощью экстракта из туники асцидии пурпурной : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Владивосток, 2006. – 22 с.
- Михайлов П.В., Муравьев А.А., Масленникова Ю.Л., Круглова Е.В. Микроциркуляция и реологические свойства крови у лиц с разным уровнем аэробной работоспособности // Ярослав. пед. вестн. – 2010. – № 3. – С. 66–70.
- Рыболовлев Ю.П., Сидяров Д.П., Афонин Н.И. Перерасчет активности константы биологической активности. – В кн.: Токсикологические аспекты безопасности готовых лекарственных форм. – М. : Мед. книга, 1981. – С. 9.
- Свербиль В.П., Захаров С.Д. Эритроциты в сдвиговом потоке: механизмы деформируемости, методы изменений, медицинские применения // Математика. Компьютер. Образование: Сб. трудов XV междунар. конф., под. общей ред. Г.Ю. Ризниченко. – Ижевск : Науч.-изд. центр «Регулярная и хаотическая динамика». – 2008. – Т. 3. – С. 123–130.
- Сернов Л.Н., Гацура В.В. Элементы экспериментальной фармакологии. – М.: Медицина, 2000. – 352 с.
- Федорова З.Д., Котовщикова М.А., Бессмельцев С.С., Попова Т.И. Об определении индекса деформируемости эритроцитов // Лаб. дело. – 1986. – № 12. – С. 732–735.
- Michiels C. Physiological and pathological responses to hypoxia // Amer. J. Pathol. – 2010. – 162, № 5. – P. 1865–1872.
- Tanner T.C., Lux K. Spreading of red cell blood suspensions on paper as a simple test of cell deformability // Acta boil. med. germ. – 1981. – 40, № 2. – P. 739–742.
- Ward A. D., Berry M. G. Optical sculpture: controlled deformation of emulsion droplets with ultralow interfacial tensions using optical tweezers // Chem. Commun. – 2006. – 12, № 5. – P. 4515–4517.

Матеріал надійшов до редакції 18.03.2013