

УДК (57.052+57.053+577.25):612.829
<https://doi.org/10.17816/MAJ19080>

ВЛИЯНИЕ ВВЕДЕНИЯ ПОЛИ-L-ЛИЗИНА НА ФОРМИРОВАНИЕ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ ПАМЯТИ У МОЛЛЮСКА *HELIX*

Л.Н. Гринкевич

ФГБУН «Институт физиологии имени И.П. Павлова» РАН, Санкт-Петербург

Для цитирования: Гринкевич Л.Н. Влияние введения поли-L-лизина на формирование долговременной памяти у моллюска *Helix* // Медицинский академический журнал. – 2019. – Т. 19. – № 4. – С. 87–92. <https://doi.org/10.17816/MAJ19080>

Поступила: 16.10.2019

Одобрена: 06.11.2019

Принята: 27.11.2019

Актуальность. К изучению эпигенетических механизмов формирования долговременной памяти приковано внимание многих ведущих лабораторий мира в связи с возможным применением полученных знаний для исправления когнитивных нарушений. Наиболее сложным звеном эпигенетической регуляции является микроРНК-зависимое подавление экспрессии генов, что связано как с огромным количеством микроРНК (десятки тысяч), так и с многообразием их мишеней. В связи с чем функции микроРНК изучены еще очень фрагментарно.

Целью исследования являлось изучение вовлечения микроРНК в формирование долговременной памяти на модели выработки условного рефлекса пищевой аверсии у моллюска *Helix*. Регистрировали нарушение образования зрелых микроРНК через введение поли-L-лизина гидробромида (PLL) — ингибитора активности эндонуклеазы Dicer.

Материалы и методы. PLL инъецировали животным спустя 1, 3 или 5 ч после обучения или в его процессе. Тестирование успешности формирования условных рефлексов проводили через 72 ч после обучения.

Результаты. Наблюдали значительное ухудшение долговременной памяти у животных, которым вводили PLL спустя 1 и 3 ч после окончания процедуры обучения по сравнению с животными, которым PLL не вводили и обучали аналогичным образом. Введение PLL во время тренировок или спустя 5 ч на долговременную память не влияло.

Заключение. Введение PLL, блокатора биогенеза микроРНК, нарушает формирование рефлекса пищевой аверсии у *Helix*. Таким образом, микроРНК вовлечены в формирование долговременной памяти у *Helix*. Нарушение экспрессии микроРНК критично для формирования долговременной памяти, если происходит в определенные временные интервалы (1–3 ч) после процедуры обучения. PLL может быть рекомендован для исследований в области эпигенетических механизмов долговременной памяти.

Ключевые слова: эпигенетика; долговременная память; оборонительные рефлексы; микроРНК; Poly-L-lysine (PLL); Dicer; моллюск *Helix*.

INFLUENCE OF PLL TREATMENT ON THE LONG-TERM MEMORY FORMATION IN *HELIX* MOLLUSK

L.N. Grinkevich

Pavlov Institute of Physiology of the RAS, Saint Petersburg, Russia

For citation: Grinkevich LN. Influence of PLL treatment on the long-term memory formation in *Helix* mollusk. *Medical Academic Journal*. 2019;19(4):87-92. <https://doi.org/10.17816/MAJ19080>

Received: October 16, 2019

Revised: November 6, 2019

Accepted: November 27, 2019

Relevance. The studies of the epigenetic mechanisms of long-term memory formation (LTM) has attracted the attention of many world leading laboratories since gained knowledge can be applied to correct cognitive impairments. miRNA dependent suppression of gene expression is the most complicated step in the epigenetic regulation, associated with a huge number of miRNAs (tens of thousands) and the diversity of their targets, thus the knowledge of miRNAs functions during LTM is still very fragmented.

Aim. The aim of this study was to investigate the involvement of miRNAs in the formation of long-term memory using the model of the food aversion conditioned reflex development in the mollusk *Helix*. Prevention of the formation

Список сокращений

ДП — долговременная память; РНК — рибонуклеиновая кислота; RISC — РНК-индуцируемый комплекс (от англ. RNA-induced silencing complex); PLL — поли-L-лизин; MAPK/ERK — митоген-активируемая протеинкиназа/внеклеточная сигнально-регулируемая киназа (от англ. mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase).

of mature miRNAs via Poly-L-lysine hydrobromide (PLL) treatment — inhibitor of Dicer activity was used as the main approach.

Materials and methods. PLL was injected into animals during training, or 1, 3 or 5 hours after training. Success of the formation of conditioned reflexes was tested 72 hours after training.

Results. There was a significant deterioration in LTM in animals with injected PLL 1 and 3 hours after training procedure compared with trained animals that were not injected with PLL. The treatment with PLL during training, or 5 hours after training, had no effect on LTM.

Conclusion. Treatment with PLL, inhibitor of miRNA biogenesis disrupts formation of the food aversion reflex in *Helix*. Thus, miRNA's are involved in the LTM formation on *Helix*. Impaired expression of miRNAs is critical for the long-term memory formation if occurs in the intervals of 1 to 3 hours after training. We can recommend PLL for the investigations in the area of the epigenetic mechanisms of long-term memory.

Keywords: epigenetics; long-term memory; aversion reflexes; miRNA; Poly-L-lysine (PLL); Dicer; *Helix mollusc*.

Введение

В последние годы в понимании механизмов пластичности мозга осуществлен значительный прорыв. Описан ряд уникальных эпигенетических механизмов, к которым относится регуляция экспрессии генов через модификацию хроматина, а также РНК-интерференция, в том числе через микроРНК. Все эти процессы интенсивно изучают в связи с механизмами формирования долговременной памяти (ДП) и применением полученных знаний для развития работ по коррекции когнитивных нарушений [1–3]. микроРНК — это некодирующие РНК, подавляющие экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. Они вовлечены в регуляцию множества процессов, в том числе в механизмы пластичности [2–5]. Количество микроРНК составляет десятки тысяч, из которых около 70 % экспрессируется в мозге. В связи с многообразием мишеней микроРНК и сложностью устройства центральной нервной системы их функции изучены еще очень фрагментарно.

Биогенез микроРНК является сложным и многоступенчатым процессом, включающим транскрипцию при-микроРНК, процессинг при-микроРНК, процессинг пре-микроРНК, загрузку микроРНК в RISC-комплекс (РНК-индуцируемый комплекс — от англ. RNA-induced silencing complex) и его сборку. В конечном счете в RISC-комплексе происходит узнавание матричной РНК-мишени и снижение ее количества путем депонирования или разрушения [4]. Все вышеперечисленные стадии контролирует целый спектр белков. Один из них — эндонуклеаза Dicer, которая является высококонсервативным ферментом. Dicer регулирует расщепление пре-микроРНК с образованием зрелой микроРНК и ее ассоциацию с комплексом RISC. Соответственно блокада Dicer нарушает созревания микроРНК и влияет на экспрессию генов-мишеней [2, 4, 6]. В ряде работ на животных с генети-

ческой модификацией биогенеза малых РНК показано, что дисфункция гена *Dicer* вызывает уменьшение количества микроРНК в коре и гиппокампе мыши и нейроморфологические дефекты и влияет на формирование ДП [7–9]. Другим подходом для изучения связи экспрессии микроРНК с формированием ДП может быть применение ингибиторов Dicer. Так, Watashi et al. [6] провели широкомасштабные исследования механизмов действия поли-L-лизина гидробромида (PLL) на биогенез микроРНК. Они установили, что это вещество снижает экспрессию микроРНК путем подавления активности Dicer через нарушение ассоциации Dicer с пре-микроРНК.

Важную роль в изучении механизмов пластичности играют животные, обладающие относительно просто устроенной центральной нервной системой, в частности моллюски [5, 10]. Для исследования молекулярных механизмов памяти в течение многих лет в качестве модели обучения мы используем выработку условного рефлекса пищевой аверсии у моллюска *Helix*. Этот рефлекс хорошо изучен на поведенческом, клеточном и молекулярном уровнях [11–13]. Нами было показано, что при формировании пищевой аверсии у *Helix*, как и у позвоночных животных, значительно изменяются эпигенетические модификации гистонов, в регуляцию которых вовлекаются как активаторные, так и тормозные пути, причем как их избыточная активация, так и ингибирование могут нарушать формирование ДП [14–16]. Как отмечалось выше, еще одним уникальным эпигенетическим механизмом регуляции экспрессии генов является ингибирование трансляции матричной РНК посредством микроРНК. Таким образом, изучение роли микроРНК в консолидации рефлекса пищевой аверсии представляет несомненный интерес.

Целью исследования являлось изучение вовлечения микроРНК в формирование дол-

говременной памяти на модели выработки условного рефлекса пищевой аверсии у моллюска *Helix*. В качестве подхода использовали нарушение образования зрелых микроРНК через введение PLL — ингибитора активности Dicer.

Методы и подходы

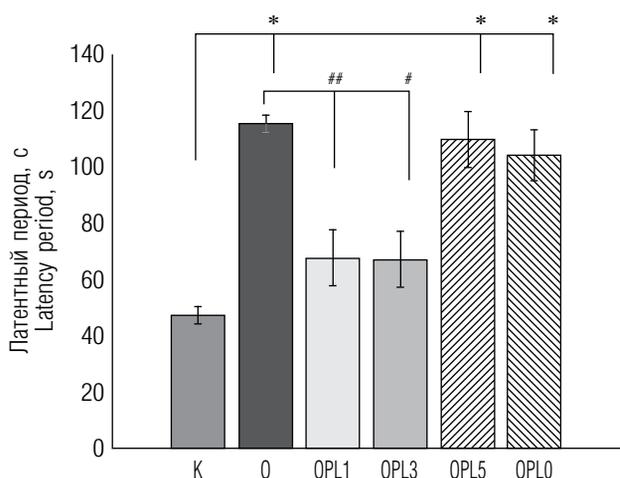
С целью изучения вовлечения микроРНК в формирование ДП у моллюска *Helix* мы осуществили блокаду образования зрелых микроРНК путем ингибирования активности Dicer [4] через введение PLL *M* 4–15 кДа (Sigma-Aldrich). PLL инъецировали животным в концентрации 30 мкг на грамм веса в объеме 10 мкл спустя 1, 3 или 5 ч после тренировок или в процессе обучения. Инъекции производили в цефалопедальный синус через нечувствительную область тела улитки. Остальным животным вводили солевой раствор для моллюсков (80 мМ NaCl; 4 мМ KCl; 7 мМ CaCl₂; 5 мМ MgCl₂; 5 мМ Tris-HCl; pH 7,8) [14], который применяли для растворения PLL. Модель обучения заключалась в выработке у *Helix* условного рефлекса пищевой аверсии. Эту модель в течение многих лет применяют в нескольких лабораториях, в том числе в нашей, поэтому она хорошо отработана [11–13]. Перед экспериментами животных 3 сут содержали без корма. Условным стимулом являлся кусочек банана, безусловным — удар электрическим током (6 мА, 0,5 с). Нижним электродом служила металлическая поверхность, по которой улитка свободно ползала. Пищу располагали на расстоянии 1 см от головы животного. После того как животное достигало пищи и начинало ее поедать, в область головы наносили удар электрическим током через второй электрод. Предъявляли пищу в сочетании с воздействием электрического тока каждые 15–20 мин. Животные получали 6–8 сочетанных воздействий. Критерием обученности являлось избегание животным пищи. Тестирование успешности обучения проводили спустя 72 ч после последней тренировки, предъявляя условный стимул — банан. При тестировании измеряли латентный период консуматорной реакции (время, которое улитка затрачивала на приближение к пище). Если животное не приближалось к пище и не начинало ее есть в течение 120 с, тест прекращали. Как правило, эти животные активно избегали пищу. При статистической обработке латентный период принимали за 120 с. Эксперименты проведены на 57 животных.

Статистическую обработку осуществляли с использованием анализа ANOVA. Различия

считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего.

Результаты исследований

Наблюдали значительное ухудшение ДП (тестирование через 72 ч) у животных, которым PLL вводили спустя 1 и 3 ч после окончания процедуры обучения, по сравнению с тренированными животными, которым вместо PLL вводили растворитель (см. рисунок).



Влияние поли-L-лизина, ингибитора Dicer, на формирование пищевой аверсии у моллюсков *Helix*. По оси ординат — латентный период консуматорной реакции животных до и после процедуры обучения. К (контроль) — животные до обучения ($n = 57$); O — обученные животные, которым поли-L-лизин не вводили ($n = 20$); OPL1, OPL3, OPL5 — животные, которым поли-L-лизин вводили спустя 1 ($n = 15$), 3 ($n = 7$) и 5 ($n = 8$) ч после обучения соответственно. OPL0 — животные, которым вводили поли-L-лизин в середине процедуры обучения ($n = 7$). Достоверное отличие от обученных животных, которым поли-L-лизин не вводили, — $^{\#}p < 0,0002$; $^{\#\#}p < 0,0001$. Unequal N HSD test. $F(5,108) = 33,703$, $p < 0,00001$ (ANOVA)

The effect of PLL, a Dicer inhibitor, on the formation of food aversia in *Helix*. On the ordinate axis — latency periods of consumatory reaction in the *Helix* before and after training. K — animals before training ($n = 57$); L — learning animals injected with saline ($n = 20$); OPL1 — learning animals injected with PLL 1 h after training ($n = 15$); OPL3 — learning animals injected with PLL 3 h after training ($n = 7$); OPL5 — learning animals injected with PLL 5 h after training ($n = 8$); OPL0 — learning animals injected with PLL during training ($n = 7$). A significant differences to control $^{\ast}p < 0.0003$. A significant difference from trained animals to which PLL was not administered, $^{\#}p < 0.0002$; $^{\#\#}p < 0.0001$. Unequal N HSD test. $F(5,108) = 33,703$, $p < 0,00001$ (ANOVA). Error bars indicate SEM

Латентный период консуматорной реакции у обученных улиток без введения PLL составлял 116 ± 3 с, а с введением PLL спустя 1 ч после окончания тренировок снижался до 68 ± 10 с ($p < 0,0001$). У животных, которым PLL вводили через 3 ч после обучения, латентный период консуматорной реакции составлял 67 ± 10 с и достоверно отличался от латентного периода у обученных животных, которым PLL не вводили ($p < 0,0002$).

Введение PLL во время тренировок или спустя 5 ч влияния на ДП не оказывало. Таким образом, инъекция PLL спустя 1 и 3 ч после процедуры обучения вызывала значительное нарушение формирования условного оборонительного рефлекса пищевой аверсии у *Helix*.

Обсуждение

Проведенные нами исследования по влиянию ингибирования активности Dicer посредством PLL на формирование условного рефлекса пищевой аверсии показали, что существуют определенные временные интервалы (1–3 ч после окончания обучения), в которые эта блокада приводит к значительному нарушению ДП. Поскольку блокада активности Dicer вызывает нарушение биогенеза микроРНК, можно предположить, что в данный временной интервал происходит экспрессия микроРНК, блокирующих матричную РНК генов-репрессоров, одним из которых может быть ингибиторный транскрипционный фактор *CREB2* [10, 17]. С помощью методов секвенирования микроРНК (miRNA-seq) было установлено, что при обучении может происходить как репрессия ряда микроРНК, так и активация, что связано с необходимостью либо активации, либо подавления их генов-мишеней, играющих разную роль в механизмах пластичности [4].

В настоящее время в нескольких работах показано, что нарушение работы Dicer влияет на формирование синаптической пластичности, ДП и других когнитивных процессов [2, 18–20]. Причем как сверхэкспрессия Dicer, так и выключение может приводить к различным функциональным нарушениям. Однако полученные данные весьма противоречивы, так как работы проведены главным образом на животных с генетическими дефектами в гене, кодирующем Dicer, и соответственно с его постоянной репрессией, в том числе и в период развития. Кроме того, применяли различные типы генетических моделей и различные модели обучения [2, 7,

19–21]. Введение PLL позволяет выключать Dicer в определенное время и поэтому более направленно изучать механизмы памяти. В 2018 г. PLL был успешно использован для нарушения формирования условного рефлекса с однократным положительным подкреплением у *Lymnaea stagnalis* [17]. В данном случае наиболее эффективным было введение PLL спустя 15 мин после обучения.

Через час после обучения в центральной нервной системе *Helix* мы наблюдали активацию регуляторного каскада MAPK/ERK и MAPK/ERK-зависимые эпигенетические модификации гистонов [12, 14, 22], что может свидетельствовать в пользу скоординированности индукции хроматиновых перестроек, экспрессии микроРНК и важной роли MAPK/ERK в этих процессах. На основе параллельного полногеномного анализа модификаций гистонов и микроРНК в 2015 г. показано наличие согласованных действий микроРНК и модификаций гистонов в регуляции экспрессии генов у человека [23].

С целью дальнейшего изучения функций индивидуальных микроРНК нами совместно с Институтом цитологии и генетики СО РАН впервые осуществлено секвенирование микроРНК из центральной нервной системы *Helix* с использованием метода miRNA-seq и биоинформатического анализа. Было обнаружено большое количество высококонсервативных микроРНК. Данные представлены в NCBI Sequence Read Archive (SRA) [24].

Высокая консервативность микроРНК позволяет успешно использовать модели обучения на животных, обладающих простыми нервными системами, для изучения функций микроРНК в механизмах пластичности. Важность исследований микроРНК определяется как фундаментальной значимостью, так и возможным прикладным значением. Предполагают, что микроРНК, экспрессия которых нарушена при различных заболеваниях, могут выступать целями для терапии [25].

Выводы

Введение PLL, блокатора биогенеза микроРНК, нарушает формирование ДП у *Helix*. Таким образом, микроРНК вовлечены в формирование рефлекса пищевой аверсии у *Helix*. Нарушение экспрессии микроРНК критично для формирования ДП, если происходит в определенные временные интервалы (1–3 ч) после процедуры обучения. PLL может быть рекомендован для исследований в области нейроэпигенетики, а именно для изучения функций микроРНК.

Дополнительная информация

Финансирование. Работа поддержана Программой фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013–2020 гг. (ГП-14, раздел 63).

Соблюдение этических норм. Не требуется.

Литература

- Chen W, Qin C. General hallmarks of microRNAs in brain evolution and development. *RNA Biol.* 2015;12(7):701-708. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1048954>.
- Liu EY, Cali CP, Lee EB. RNA metabolism in neurodegenerative disease. *Dis Model Mech.* 2017;10(5):509-518. <https://doi.org/10.1242/dmm.028613>.
- Swarbrick S, Wragg N, Ghosh S, Stolzing A. Systematic review of miRNA as biomarkers in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol.* 2019;56(9):6156-6167. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1500-y>.
- Aksoy-Aksel A, Zampa F, Schrat G. MicroRNAs and synaptic plasticity — a mutual relationship. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014;369(1652). <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0515>.
- Rajasethupathy P, Fiumara F, Sheridan R, et al. Characterization of small RNAs in *Aplysia* reveals a role for miR-124 in constraining synaptic plasticity through CREB. *Neuron.* 2009;63(6):803-817. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.05.029>.
- Watashi K, Yeung ML, Starost MF, et al. Identification of small molecules that suppress microRNA function and reverse tumorigenesis. *J Biol Chem.* 2010;285(32):24707-24716. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.062976>.
- Konopka W, Kiryk A, Novak M, et al. MicroRNA loss enhances learning and memory in mice. *J Neurosci.* 2010;30(44):14835-14842. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3030-10.2010>.
- Babiarz JE, Hsu R, Melton C, et al. A role for noncanonical microRNAs in the mammalian brain revealed by phenotypic differences in *Dgcr8* versus *Dicer1* knockouts and small RNA sequencing. *RNA.* 2011;17(8):1489-1501. <https://doi.org/10.1261/rna.2442211>.
- Davis TH, Cuellar TL, Koch SM, et al. Conditional loss of *Dicer* disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus. *J Neurosci.* 2008;28(17):4322-4330. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4815-07.2008>.
- Kandel ER. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Mol Brain.* 2012;5:14. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-5-14>.
- Balaban PM. Cellular mechanisms of behavioral plasticity in terrestrial snail. *Neurosci Biobehav Rev.* 2002;26(5):597-630. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(02\)00022-2](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(02)00022-2).
- Grinkevich LN, Lisachev PD, Kharchenko OA, Vasil'ev GV. Expression of MAP/ERK kinase cascade corresponds to the ability to develop food aversion in terrestrial snail at different stages of ontogenesis. *Brain Res.* 2008;1187:12-19. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.08.029>.
- Nikitin VP, Solntseva SV, Kozyrev SA, et al. Different components of conditioned food aversion memory. *Brain Res.* 2016;1642:104-113. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.03.017>.
- Danilova AB, Grinkevich LN. Failure of long-term memory formation in juvenile snails is determined by acetylation status of histone H3 and can be improved by NaB treatment. *PLoS One.* 2012;7(7):e41828. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041828>.
- Grinkevich LN, Vorobiova OV. Opposing roles of serotonin and neuropeptide FMRFamide in the regulation of epigenetic processes involved in the long-term memory formation. *Russian Journal of Genetics: Applied Research.* 2017;7(3):273-280. <https://doi.org/10.1134/S2079059717030054>.
- Гринкевич Л.Н., Зачепило Т.Г. Регуляция ацетилирования гистона H4 в центральной нервной системе и командных нейронах оборонительного поведения моллюска *Helix* серотонином и нейропептидом FMRFамидом // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2018. — Т. 22. — № 5. — С. 606–610. [Grinkevich LN, Zachepilo TG. Regulation of histone H4 acetylation in the CNS and defensive behavior command neurons of the mollusk *Helix* mediated by serotonin and neuropeptide FMRFamide. *Vavilov journal of genetics and breeding.* 2018;22(5):606-610. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.18699/VJ18.401>.
- Korneev SA, Vavoulis DV, Naskar S, et al. A CREB2-targeting microRNA is required for long-term memory after single-trial learning. *Sci Rep.* 2018;8(1):3950. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22278-w>.
- Lugli G, Larson J, Martone ME, et al. Dicer and eIF2c are enriched at postsynaptic densities in adult mouse brain and are modified by neuronal activity in a calpain-dependent manner. *J Neurochem.* 2005;94(4):896-905. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03224.x>.
- Fiorenza A, Lopez-Atalaya JP, Rovira V, et al. Blocking miRNABiogenesis in adult forebrain neurons enhances seizure susceptibility, fear memory, and food intake by increasing neuronal responsiveness. *Cereb Cortex.* 2016;26(4):1619-1633. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhu332>.
- Fiorenza A, Barco A. Role of Dicer and the miRNA system in neuronal plasticity and brain function. *Neurobiol Learn Mem.* 2016;135:3-12. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.05.001>.
- Chmielarz P, Konovalova J, Najam SS, et al. Dicer and microRNAs protect adult dopamine neurons. *Cell Death Dis.* 2017;8(5):e2813. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.214>.
- Grinkevich LN, Vorobiova OV. Role of modulatory mediator serotonin in induction of epigenetic processes during

- long-term memory formation in *Helix*. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 2014;4(6):526-532. <https://doi.org/10.1134/s2079059714060094>.
23. Wang X, Zheng G, Dong D. Coordinated action of histone modification and microRNA regulations in human genome. *Gene*. 2015;570(2):277-281. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.06.046>.
24. Vasiliev GV, Ovchinnikov VY, Grinkevich LN. Sequencing of *Helix lucorum* central nervous system small RNAs. NCBI Sequence Read Archive (SRA) SRP136226. 2018.
25. Hu S, Wang H, Chen K, et al. MicroRNA-34c down-regulation ameliorates amyloid-beta-induced synaptic failure and memory deficits by targeting VAMP2. *J Alzheimers Dis*. 2015;48(3):673-686. <https://doi.org/10.3233/JAD-150432>.

Сведения об авторе / Information about the author

Лариса Николаевна Гринкевич — ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции функций нейронов мозга, ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН, Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0003-3744-5946>. SPIN-код: 4925-6575. Author ID: 80116. E-mail: larisa_gr_spb@mail.ru.

Larisa N. Grinkevich — Principal Scientist at the Laboratory for Regulation of the Function of Brain Neurons. Pavlov Institute of Physiology of the RAS, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0003-3744-5946>. SPIN-code: 4925-6575. Author ID: 80116. E-mail: larisa_gr_spb@mail.ru.