

РАССЕЯННЫЙ СКЛЕРОЗ. ОБОСНОВАНИЕ ГЕРОПРОТЕКТИВНОЙ ТЕРАПИИ

С.В. Лобзин, В.И. Головкин, Ю.Ф. Камынин, Л.С. Онищенко, Ю.О. Гарьшина, А.С. Сагиян

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова,
г. Санкт-Петербург, Россия

Резюме. У 76 больных рассеянным склерозом в возрасте $33,6 \pm 2,7$ лет изучены результаты иммунологических анализов крови и ликвора по выявлению ассоциации частоты выявления генетических маркеров локуса HLA-DrB1 и коэффициента асинхронного интрацеллюлярного синтеза свободных лёгких цепей иммуноглобулинов (К κ/λ), а также состояние электронно-транспортной цепи митохондрий и плотность нейротрансмиттерных рецепторов клеток головного мозга. При экспериментальном аллергическом энцефаломиелите у 12 нелинейных морских свинок проведена электронная микроскопия препаратов ультратонких срезов участков головного мозга изъятых у животных на высоте болезни. Получена слабая ассоциация иммунологических и генетических показателей и высокодостоверные морфофункциональные нарушения митохондриального аппарата клеток мозга и нейротрансмиттерные девиации в сторону ноцицептивных процессов при одновременном ослаблении центральных антиноцицептивных механизмов. Сделано заключение о наличии у больных рассеянным склерозом признаков раннего патологического старения и о необходимости геропротективной терапии.

Ключевые слова. Рассеянный склероз, экспериментальный аллергический энцефаломиелит, коэффициент асинхронного интрацеллюлярного синтеза лёгких цепей иммуноглобулинов каппа и лямбда, лейкоцитарное фенотипирование, электронная микроскопия, электронно-транспортная цепь митохондрий, нейротрансмиттеры: гистамин, серотонин, норадреналин, дофамин, старение, геропротективная терапия.

Введение

Рассеянный склероз (РС) считается аутоиммунным заболеванием наряду с ревматизмом, красной волчанкой, зобом Хашимото, сахарным диабетом 1 типа [1, 2, 3], однако многочисленные экспериментальные исследования и данные клинических наблюдений показали, что очаги демиелинизации могут возникать под действием токсических веществ (свинец, мышьяк, цианистый калий, сапонин, таурохолат натрия, яд кобры, столбнячный токсин, дифтерийный токсин, некоторые барбитураты: нембутал, сомьяifen и др.), эндогенных токсинов и липолитических ферментов (лецитиназа, цефалиназа и др.), нарушений питания и обмена веществ, сосудистых заболеваний, инфекционных агентов, парентерально введенных неспецифических веществ и мозговой ткани. Отсутствие единого причинного фактора в развитии процесса демиелинизации и взгляд на демиелинизацию как на неспецифический процесс дали основание считать, что РС является этиологически неоднородным заболеванием [4]. Специалисты, придерживающиеся только иммунопосредованного патогенеза РС, допускают в клинической практике гипердиагностику РС в 23,5% случаев [5], при этом никакой метод иммуно-

тропного лечения не прекращает синтез олигоклонального IgG – главного признака прогрессивности заболевания [6]. Наше изучение роли иммунных реакций показало, что только треть случаев РС связаны с клеточной (39,6% положительных результатов в РБТЛ с ОБМ) и гуморальной (31,25% случаев выявления антипел к ОБМ: 16,95% IgM и 20,33% IgG) сенсбилизацией к мозгоспецифическим белкам [7]. У тех же больных в 75% случаев при ПЭТ головного мозга обнаружен гипометаболизм глюкозы в корковых и мозжечковых нейронах, т.е. в основных структурно-функциональных элементах связанных с развитием ведущего пирамидно-мозжечкового синдрома в клинической картине РС. Специальные ПЭТ-исследования показали более чем 8-10-ти кратное превышение зон гипометаболизма глюкозы, по сравнению с очаговым поражением мозга, выявляемое при МРТ-морфометрии [8]. Всё вышеизложенное делает необходимым изучение других (не иммунных) факторов патогенеза и возможностей других (не иммунотропных) путей лечения и профилактики РС.

Цель исследования

Используя современные методы диагностики иммунопатологических, метаболических и

морфологических изменений при РС, выявить не иммунные факторы патогенеза и обосновать новые направления терапии данного заболевания.

Материал и методы исследования

У 76 больных с достоверным прогрессивно-ремитирующим РС (50 ж, 26 м) в возрасте $33,6 \pm 2,7$ лет со степенью инвалидизации по шкале EDSS от 3-х до 5,5 баллов проведено комплексное диагностическое исследование, включающее выявление носителей аллеля HLA-DrB1*15:01 методом ПЦР (ЦНИИ гематологии и трансфузиологии, ст. н. с. Павлова И.Е.), определение интратекального синтеза каппа и лямбда свободных лёгких цепей иммуноглобулинов (лаборатория диагностики аутоиммунных заболеваний 1-го СПбГМУ им. И.П. Павлова, зав. лаб. к.м.н. С.В. Лапин) и 25 метаболитов мозга при суперпозиционном электромагнитном сканировании [9], (СПЭМС-2 «Обнинск», НИЦ изучения эволюции человека РАЕН, к.м.н. Ю.Ф. Камынин). Морфологические характеристики митохондрий изучались с помощью электронной микроскопии мозга нелинейных морских свинок (12 особей обоего пола, весом 400-450 г), инокулированных основным белком миелина (препарат фирмы Sigma, USA) с адьювантом Фрейнда (энцефалитогенная смесь – ЭГС), на 13-19 день максимального развития заболевания – экспериментального аллергического энцефаломиелита (ЭАЭ) – общепризнанной модели РС. Клиническая картина ЭАЭ соответствовала спинальной и цереброспинальной форме поражения при РС: параличи задних лап с повышенными рефлексам и признаками спинального автоматизма, нарушения функции мочеиспускания и дефекации, вертячка и двигательная атаксия с падением на бок (к.м.н. Ю.Л. Житнухин, отдел иммунологии ИЭМ РАН). На высоте ЭАЭ животные забивались, и тут же осуществлялась пропитывание и заливка препаратов смесью эпона с аралдитом приготовленных из коры больших полушарий, стволовых отделов мозга, мозжечка и грудного отдела спинного мозга. Ультратонкие срезы 20-40 нм контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца. Изучение ультраструктуры митохондрий нейронов и фото съемка проводились к.б.н. Л.С. Онищенко в лаборатории электронной микроскопии ВМедА на микроскопе Hitachi (Япония).

Результаты исследования

Иммунологические исследования (HLA типирование у 40 человек и определение СЛЦ каппа и лямбда в ликворе у 56 человек) показали неоднозначные результаты.

Так, наличие аллеля DRD1*15 обнаружено только у 30% обследованных, DRB1*01 – у 10%, DRB1*17 не обнаружено вообще, т.е. гаплотип прогрессивного течения РС Dr2-Dr3 отсутствовал у данных пациентов, что ставило под сомнение необходимость обычно назначаемой агрессивной терапии: митоксантрон, циклофосфан, бета-интерфероны и т.п., приводящей к истощению эндогенного левокарнитина [10].

Интратекальный синтез СЛЦ каппа (κ) и лямбда (λ) по характерному для РС коэффициенту κ/λ в диапазоне 0,26-1,65 выявлен только у 43% больных.

Далее, в связи с тем, что проведение нервного импульса имеет биохимический эквивалент в форме активности нейротрансмиттерной системы, выполнено СПЭМС-сканирование мозга с выделением резонансных показателей от рецепторов серотонина, гистамина, норадреналина и дофамина. Пики электромагнитного резонанса от рецепторов для серотонина и гистамина оказались выше изолинии на $1,4 \pm 0,02$ в 61% случаев и $4,1 \pm 0,02$ у.е. в 75% случаев ($p < 0,05$ и $0,01$ соответственно). Пики резонанса от рецепторов для норадреналина и дофамина были ниже изолинии на $1,7 \pm 0,02$ в 93% случаев и $1,9 \pm 0,03$ у.е. в 94% случаев ($p < 0,001$ для обоих нейротрансмиттеров).

Поскольку ранее проведённая ПЭТ головного мозга больных РС с радиофармпрепаратом глюкозы выявила низкий захват этого главного энергизатора организма клетками серого вещества мозга (кора и мозжечок), то интересно было узнать причину этого. Почему же клетки мозга не потребляют глюкозу, которая должна бы активно окисляться митохондриями с образованием энергии, жизненно необходимой, в том числе и для выздоровления? С целью определения количественных характеристик дыхательной цепи митохондрий: цитохромов (ЦХ a,b,c), убихинона (Со Q) и цитохром-С-оксидазы (ЦХ-С-окс) выполнено СПЭМС-сканирование головного мозга больных РС с выделением резонанса от этих субстанций.

Все изучаемые показатели митохондриальной электроннотранспортной цепи (ЭТЦ) больных РС имели достоверные ($p < 0,05$) отрицательные значения, т.е. их кривая на графике СПЭМС располагалась существенно ниже условных референтных значений: ЦХ a – $3,0 \pm 0,05$ у.е. в 80%; ЦХ b – $4,7 \pm 0,07$ в 79%; ЦХ c – $3,1 \pm 0,06$ в 68%; Со Q – $2,9 \pm 0,04$ в 90% и ЦХ-С-окс – $3,3 \pm 0,05$ в 85% случаев.

В целом, при обследовании с помощью СПЭМС больных РС получены данные, указывающие на глубокие метаболические сдвиги,

закрывающиеся в лактат-ацидозе, тканевой гипоксии, вследствие нарушения функции каскада дыхательных ферментов убихинона и цитохрома, повышении перекисного окисления с появлением гидроперекисей, в снижении функциональной активности нейротрансмиттеров (по плотности никотиновых и мускариновых ацетилхолиновых рецепторов, концентраций дофаминовых, адреналиновых, норадреналиновых и гистаминовых медиаторов, плотности рецепторов мозжечка и ствола мозга к 5-окситриптофану).

В качестве типичного примера приводим графическое изображение данных СПЭМС ферментных систем больного К (рис. 1).



Рис. 1. Суперпозиционное электромагнитное сканирование головного мозга со спектрографией и спектрометрией ферментных систем у 6-го К, 35 лет, вторично-прогредиентное течение РС, фаза неустойчивой ремиссии, EDSS=4,5 балла: редукция каскада дыхательных ферментов в условиях уменьшения сукцинатного способа окисления, повышение уровня лактата при снижении уровня пирувата, снижение активности кретинфосфокиназы (КФК), накопление перекисей и гидроперекисей (H₂O₂, OH).

К сожалению, ультраструктурные исследования при аутопсии случаев РС не удалось провести из-за технических особенностей патанатомической службы. Поэтому, выполнены соответствующие эксперименты на животных. При электронной микроскопии препаратов мозговой ткани у заболевших животных (10 из 12 особей) в клетках мозга нами наблюдалась вакуолизация митохондрий и значительное увеличение их числа (плейокония). В осевых цилиндрах миелиновых волокон встречались крупные митохондрии, кристы которых были закручены в спиралевидную форму, что считается доказательством дистрофических изменений клеток, т.к. сопровождается сниженной активностью ключевого фермента митохондрий – ци-

тохром-оксидазы. В ряде случаев в цитоплазме отдельных нейронов, олигодендроцитов и леммоцитов митохондрии имели пластинчатое или паракристаллическое строение и нередко находились вблизи ядра этих клеток. Митохондрии с такой структурой встречались также в аксоплазме безмиелиновых волокон (рис. 2). Ранее аналогичные паракристаллические структуры, названные цитосомами, детально были описаны при липофусцинозе (старении) нейронов. У не заболевших животных (2 особи) при микроскопировании препаратов в участках цитоплазмы клеток Пуркинье обнаруживались скопления митохондрий с почти неизменной структурой, а миелиновые волокна мозжечка содержали митохондрии с нормальной структурой, находившиеся в тесном контакте с миелином (рис. 3).

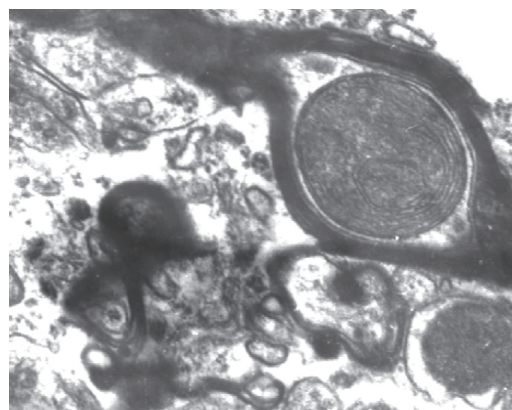


Рис. 2. Миелиновые волокна головного мозга морской свинки с ЭАЭ. В осевом цилиндре – концентрическая структура митохондрии. Увеличение: X 26000.

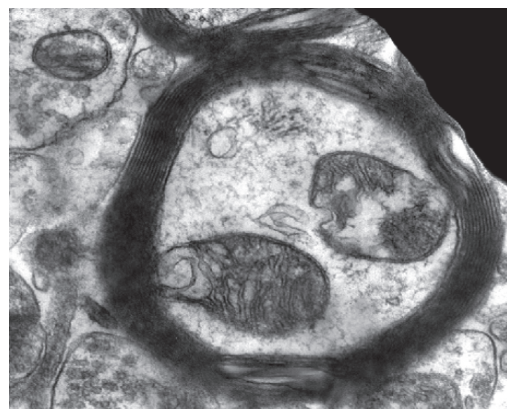


Рис. 3. Крупная митохондрия (в центре) с сохраненными кристами в дендрите нейрона коры большого мозга морской свинки не заболевшей ЭАЭ. Увеличение: X 25000.

Обсуждение результатов исследования

Морфофункциональные исследования митохондрий.

На модели РС нами показано развитие патоморфологии митохондрий клеток мозга: нейронов, миелинообразующих олигодендроцитов, миелинизированных, маломиелинизированных волокон и безмиелиновых участков аксонов и дендритов, происходящей, по-видимому, вследствие ишемической гипоксии, о которой мы писали ранее на основе световой микроскопии исследования сосудов мозга на аутопсийных препаратах [11, 12]. При этом нарушения ЭТЦ по данным СПЭМС достигало 80-95% как на внутренней мембране, так и в межмембранном пространстве митохондрий. Определение митохондриальных дегидрогеназ в крови больных РС (ГДГ, СДГ, ЛДГ, ГФДГ) тоже указывает на снижение функций митохондрий [13] и, что интересно, в таком же % случаев, как и при изучении ЭТЦ – 88, 67, 80,75 % соответственно.

Известно, что в дегенеративных изменениях нервной ткани огромное значение имеет свободнорадикальное окисление (СРО), которое, воздействуя на мембраны нейронов и олигодендроглиоцитов, запускают процесс АДФ-рибозилирования, что приводит к истощению запасов АТФ и высвобождению новых активных форм кислорода (АФК). Эндогенная антиоксидантная система, которая ослабляет СРО на ранней стадии, пользуется реакцией восстановления глутатиона. При хронизации патологических процессов происходит снижение концентрации глутатиона в клетках, что снижает защиту от СРО. Прежде всего, страдают дыхательные ферменты митохондрий, на территории которых и развиваются первые морфологические разрушения [14]. «Несанкционированное» сгорание энергетических запасов клеток и «удушьё» их митохондрий ускоряет аксональную дегенерацию, что является трудно обратимым процессом и приводит к появлению грубых клинических неврологических дефектов и к инвалидности. Это весьма сходно с процессами, наблюдаемыми при старении организма, что и отражено в свободнорадикальной и митохондриальной теориях старения [15, 16].

Иммунологические исследования.

Выявление при гистотипировании характерного для РС аллеля в 30% случаев хоть и укладывается в «норматив» 20-60%, приводимый в литературе, но относится лишь к одному из 3-х HLA-DRB1 показателей связи РС с фенотипи-

ческой рестрикцией. Да и вклад этих генов в развитие РС меньше, чем в случаях других аутоиммунных заболеваний, а аллель главного провосполнительного цитокина РС TNF α не входит в единый гаплотип с аллелем DRB*1501. Всё это говорит о слабой генетической ассоциации с клинически определяемым РС.

Роль олигоклонального IgG в патогенезе РС до конца не ясна. Известно только то, что иммуноглобулины синтезируются В-лимфоцитами в областях, прилегающих к зонам демиелинизации, но это происходит и при любых васкулитах. Если при расчёте результатов лабораторных анализов использовать не просто концентрацию СЛЦ в мкг/мл, а коэффициент их асинхронного синтеза (К к/л) [17], то частота выявления интратекального присутствия СЛЦ каппа составит только 43%, а не 93%, как это обычно пишется в литературе [18].

Нейротрансмиттерные нарушения.

Статистически достоверное повышение плотности серотониновых и гистаминовых и снижение плотности норадреналиновых и дофаминовых рецепторов на клетках мозга говорит о многом. Во-первых, НА является медиатором голубоватого пятна, включённого в патогенез оливо-пункто-церебеллярной дегенерации, которая, между прочим, проявляется не только нистагмом, атаксией, но и артериальной гипотензией, гипогликемией и немотивированной усталостью, т.е. симптомами, выявляемыми и при РС. Во-вторых, серотонин(5-НТ)эргические нейроны группируются в варолиевом мосту, а серотонин повышает проницаемость ГЭБ, усиливает перивенозное воспаление, способствует стазу крови. Вместе с гистамином серотонин относится к медиаторам гиперчувствительности немедленного типа (ГНТ). В-третьих, дофамин (ДА) является медиатором двигательной функции мозга, фактором внутреннего подкрепления и эндогенной психической энергии [19].

Известно также и то, что серотонин и гистамин являются маркерами ноцицептивных разрушительных процессов в организме, а НА и ДА – антиноцицептивных [20]. Следует добавить, что катехоламины образуются из аминокислоты тирозина поэтапно: фенилаланин-тирозин-дофамин-норадреналин, а чувствительность адренорецепторов обеспечивается гормонами щитовидной железы (до 14-15 летнего возраста) и надпочечников (после 16-18 летнего), т.е. в период инициации РС уже имеются эндокринно-метаболические девиации.

Заключение

Таким образом, иммунологические реакции не занимают ведущего места в патогенезе всех случаев РС и являются, скорее всего, эпифеноменами демиелинизации. До развития воспалительной демиелинизации, а, тем более, до аксональной дегенерации происходят метаболические нарушения, развивается параметаболизм, носящий ноцицептивную направленность. Центральным местом этих процессов является митохондриальная дисфункция клеток ЦНС. Поскольку это происходит у людей 20-ти – 30-ти летнего возраста и сопровождается клинической симптоматикой, то это может называться патологическим старением организма. Ретардаторами старения в данных случаях должны являться антиоксиданты митохондриальной направленности [21, 22] и другие антиноцицептивные мероприятия.

Литература

1. Poser Ch. / Ch. M. Poser. The diagnosis of Multiple Sclerosis.-Thieme-Stration inc., 1984.– 254 p.
2. Abramsky O. / O. Abramsky, H. Ovidia. Fronters in Multiple Sclerosis. – Martin Dunitz, 1997. – 318 p.
3. Гусев Е.И. / Е.И. Гусев, И.А. Завалишин, А.Н. Бойко. Рассеянный склероз, М.: Реал Тайм, 2011. – 528 с.
4. Зинченко А.П. / А.П. Зинченко. Рассеянный склероз и рассеянный энцефаломиелит. Л.: Медицина, 1973. – 350 с.
5. Врачебно-трудовая экспертиза при рассеянном склерозе. [Электронный ресурс]. – Режим доступа – <http://www.blackpantera.ru/profzabolevanija/32972/>.
6. McDonald W.I. / W.I. McDonald, A. Compston, G. Edan et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis // Ann. Neurology. – 2001. – 59 (1). – P. 121-127.
7. Фоминцева М.В. / М.В. Фоминцева. Ранняя клиничко-инструментальная и лабораторная диагностика рассеянного склероза // Автореф..... канд. мед. наук, СПб, 2016. – 24 с.
8. Головкин В.И. / В.И. Головкин, И.Д. Столяров, А.Д. Коротков и др. Позитронно-эмиссионная томография в комплексе клиничко-морфологических исследований мозга при рассеянном склерозе // Актуал. вопр. клин. и военн. неврологии. СПб, 1997. – 64.
9. Меткин Н.П. / Н.П. Меткин. Патент на изобретение № 2290869. Заявка № 20519763. Приоритет изобретения 24 июня 2005 г. Зареги-
- стрировано в Госреестре изобретений РФ 10 января 2007 г. Срок действия патента 24.06. 2025 г.
10. Lebrum C. / C. Lebrun, H. Alchaar, M. Candito, V. Bourg et al. Levocarnitine administration in multiple sclerosis patients with immunosuppressive therapy – induced fatigue: correlation with carnitine serum levels / Multiple Sclerosis (20th ECTRIMS), 2004. – V. 10. – suppl. 2. – P. 125-127.
11. Головкин В.И. / В.И. Головкин. Рассеянный склероз в формате 3D, СПб.: «Человек», 2014. – 178 с.
12. Бисага Г.Н. / Г.Н.Бисага, О.Н. Гайкова, Л.С. Онищенко и др. Рассеянный склероз: от морфологии к патогенезу. – СПб, 2015. – 104 с.
13. Котов С.В. / С.В. Котов, О.П. Сидоров, Е.В. Бородатая // Митохондриальная недостаточность при рассеянном склерозе // ЖНИП им. С.С. Корсакова. 2015. – Т. 15. – В. 2. – С. 61-62.
14. Campbel G.R. / Graham R. Campbel, Joseph T. Worrall, Don J. Mahad. Центральная роль митохондрий в аксональной дегенерации при рассеянном склерозе // Multiple Sclerosis Journal (rus), 2015. – Т. 1. – № 1. – С. 102-108.
15. Gruber J. / Jan Gruber, Sebastian Schaffer, Barry Halliwell. The mitochondrial free radical theory of ageing – Where do we stand? // Frontiers in Bioscience 13, 6554-6579, May 1, 2008.
16. Трубицын А.Г. Модифицированный вариант митохондриальной теории старения // Успехи геронтологии, 2016. – Т. 18. – С. 21-28.
17. Fischer C. / C. Fischer, B. Arneth, J. Koehler, J. Lotz, K.J. Lackner. Kappa free light chains in cerebrospinal fluid as markers of intrathecal immunoglobulin synthesis. Clin Chem., 2004, Vol. 50, pp. 1809-1813.
18. Самойлович М.П. / М.П. Самойлович, И.В. Грязева, А.В. Мазинг, С.В. Лапин, В.Б. Климович. «Имунометрический метод определения концентраций свободных легких цепей иммуноглобулинов человека» // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 4. С. 385-394. doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-385-394.
19. Зайко Н.Н. / Н.Н. Зайко (ред.). Патологическая физиология, М.: МЕД пресс информ, 2015. – 734 с.
20. Орлов Р.С. / Р.С. Орлов. Нормальная физиология: учебник. М.: ГЭОТАР – Медиа, 2010. – 832 с.
21. Рожнов Г.И. / Г.И. Рожнов, В.А. Проинова, Т.А. Воронина. Особенности противогипоксического и метаболического действия мексидола в широком диапазоне доз // J. hypoxia medical, 1996. – № 2. – С. 56-57.
22. Skulachev V.P. / V.P Skulachev Mitochondria-targeted antioxidants as a tool to prevent aging related diseases and prolong lifespan // Advances in Gerontology, SPb, 2007. – S. 71.

В.И. Головкин

Тел.: +7 (911) 917-37-59

E-mail: golovkin@hotmail.com

С.В. Лобзин, В.И. Головкин, Ю.Ф. Камынин, Л.С. Онищенко, Ю.О. Гарышина, А.С. Сагиян. Рассеянный склероз. Обоснование геропротективной терапии // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета. – 2017. – Т. 9. – № 3. – С. 47-52.

MULTIPLE SCLEROSIS. JUSTIFICATION OF GEROPROTECTIVE THERAPY

S.V. Lobzin, V.I. Golovkin, Y.F. Kamynin, L.S. Onischenko, Y.O. Garyshina, A.S. Sagiyan

North-Western State Medical University names after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia

Summary. Results of immunological blood count and liquor test taken from 76 patients with multiple sclerosis aged $33,6 \pm 2,7$ were studied to determine genetic markers of locus HLA-DrB1 and asynchronous intrathecal synthesis ratio of immunoglobulin free light chain (K κ/λ), as well as state of mitochondrial electron transport chain and density of neurotransmitter receptors of brain cells. 12 laboratory Guinea pigs with experimental allergic encephalomyelitis were taken to conduct electron microscopy of ultrathin brain sections collected from animals at the peak of the disease. Weak association of immunological and genetic indicators and statistically significant morphofunctional abnormalities of mitochondrial apparatus of brain cells as well as neurotransmitter deviations towards nociceptive processes with simultaneous weakening of central antinociceptive mechanisms was found. The conclusion is that patients with multiple sclerosis have early pathologic aging so early geroprotective therapy is required.

Key words. Multiple sclerosis, experimental allergic encephalomyelitis, asynchronous intrathecal synthesis ratio of immunoglobulin light chain kappa and lambda, leukocytic phenotyping, electron microscopy, mitochondrial electron transport chain, neurotransmitter: histamine, serotonin, noradrenaline, dopamine, aging, geroprotective therapy.

Authors

V.I. Golovkin

Тел.: +7(911)917-37-59

E-mail: golovkin@hotmail.com

T.N. Reznikova, N.A. Seliverstova, S.V. Lobzin, V.I. Golovkin, Y.F. Kamynin, L.S. Onischenko, Y.O. Garyshina, A.S. Sagiyan. Multiple sclerosis. Justification of geroprotective therapy // Herald of the Northwestern State Medical University named after I.I. Mechnikov. – 2017. – Т. 9. – № 3. – P. 47-52.