«Фундаментальные и прикладные проблемы медицины и биологии», ОАЭ (Дубай), 16-23 октября 2011 г.

Медицинские науки

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ГЕНОТИПИРОВАНИЕ СТАФИЛОКОККОВ, КОЛОНИЗИРУЮЩИХ ЖИТЕЛЕЙ КРУПНОГО ПРОМЫШЛЕННОГО ГОРОДА

Антонов В.А., Крамарь В.О., Климова Т.Н., Савченко С.С., Панченко А.В., Прокопенко К.М., Пестов А.Ю.

Волгоградский государственный медицинский университет; Волгоградский противочумный научно-исследовательский институт, Волгоград, e-mail: klimova1977@mail.ru

Единство организма и окружающей среды – одно из важнейших положений природы. Частным отображением этого единства является нормальный симбиоз человека с миром микробов [6].

Макроорганизм и населяющая его микрофлора являются единой экологической системой, находящейся в состоянии динамического равновесия, которое принято обозначать как эубиотическое состояние – эубиоз системы и связывать с состоянием здоровья макроорганизма [4].

Состав биоценоза находится под постоянным контролем разнообразных механизмов, присущих человеку и поступательно развивающихся у него с течением времени в различные периоды физиологической адаптации [1].

Установлено, что в каждом биоценозе регистрируются как резидентные, так и транзиторные микроорганизмы, среди которых немаловажное значение имеют условно-патогенные представители [2].

При самых разнообразных внешних воздействиях (техногенное загрязнение окружающей среды), экстремальных условиях, стрессовых ситуациях происходят качественные и количественные изменения нормальной микрофлоры [4].

При изучении влияния экологических факторов на здоровье человека весьма актуальным остается поиск новых неинвазивных методов, одним из которых является исследование качественного и количественного состава аутофлоры.

Среди возбудителей инфекционных заболеваний с различными клиническими проявлениями большое место принадлежит стафилококкам, которые на протяжении последнего столетия являются одним из наиболее значимых оппортунистических патогенов в медицинской практике [3].

Существует мнение, что приобретение маловирулентными микроорганизмами новых детерминант вирулентности, формирование клонов с новыми свойствами и их распространение происходит с частотой не меньшей, чем распространение клонов антибиотикорезистентных бактерий.

Молекулярно-генетический анализ и внедрение молекулярных методов типирования в эпидемиологические исследования явилось мощным инструментом идентификации и изучения механизмов формирования эпидемически значимых штаммов микроорганизмов.

Целью работы является анализ распространенности Staphylococcus spp. в популяции здоровых и больных хирургических, терапевтических стоматологических клиник г. Волгограда, а также оценка генетической гетерогенности и генотипирования штаммов S. aureus и коагулазонегативных стафилококков, выделенных в популяции здоровых и больных людей г. Волгограда.

Для решения поставленной цели было проведено обследование 449 практически здоровых людей (группа сравнения), 578 больных хирургической, терапевтической стоматологической клиники.

Методы исследования. Бактериологическому обследованию подвергнуты слизистая оболочка полости рта и кожи (кожа головы, груди, спины, живота, межпальцевых промежутков, промежность). Получено и подвергнуто индентификации 545 штаммов микроорганизмов. Выделение стафилококков от больных и бактерионосителей проводили в соответствии с «Методическими рекомендациями по обнаружению и идентификации бактерий рода Staphylococcus» (МЗ СССР, 1990) по совокупности морфологических, тинкториальных, культуральных свойств. Биохимическую активность оценивали с использованием коммерческих тест-систем «Minitek» (Becton Dickinum, США) и Staphytest (Lachema, Чехия).

Способность стафилококков к инактивации факторов естественной резистентности (ФЕР) определялась по методам, разработанным О.В. Бухариным с соавт. (1984), патент РФ № 2010860, основанным на едином принципе – обнаружение феномена протективного действия испытуемых культур и их внеклеточных продуктов в отношении роста индикаторных штаммов микроорганизмов, высокочувствительных к отдельным компонентам системы ФЕР.

Скрининг штаммов микроорганизмов на наличие плазмидной ДНК проводили в соответствии с методикой, предложенной Т. Маниатис с соавт. [5] с модификациями.

Тотальную ДНК выделяли модифицированным методом, предложенным J. Marmur. ДНК растворяли в ТЕ-буфере, определяли концентрацию на флуорометре ТКО 100 («Hoefer», США) и хранили при +4 °С.

В реакции амплификации использовали произвольные праймеры с различным процентом GC пар: праймер А (GTTTCGCTCC), праймер 6 (GAGACGCACA), праймер 7 (CAGCCCAGAG), праймер 13 (AGCGTCACTC), синтезированные в НПФ «Синтол» (Москва).

Амплификацию продолжительностью 45 циклов проводили на мультициклере «Терцик» (НПФ «ДНК-технология», Москва) с использованием «горячего старта». Реакционная смесь в объеме 25 мкл содержала 0,02 мМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 100 pmol праймирующего олигонуклеотида, 1 ед. Taq-полимеразы и 100 нг анализируемой геномной ДНК. На поверхность смеси наслаивали 30 мкл минерального масла. Для проведения ПЦР с произвольными праймерами использовали буфер и Taq-полимеразу производства ЦНИИ Эпидемиологии (Москва). Температурный режим реакции состоял из денатурации при 94 °С в течение 30 с, отжига праймеров при 36 °С в течение 30 с. Элонгацию цепи при 72 °С проводили в течение 120 с.

Для обнаружения гена стафилококкового энтеротоксина (sea) использовали праймеры, предложенные S. Jarraud [11] с соавторами. Детекцию капсулярного генотипа методом ПЦР проводили с помощью литературных праймеров [14]. Выявление в реакции амплификации фрагментов гена α-гемолизина (*hla*) проводили с помощью общепринятых олигонуклеотидных затравок [11].

Анализ продуктов ПЦР осуществляли методом гель-электрофореза в 1,5 и 3 % (5 В/см) агарозном геле с окраской фрагментов ДНК этидиум бромидом (0,5 мкг/мл) и визуализацией в УФ-свете. В качестве маркера использовали плазмиду pUC19, гидролизованную эндонуклеазой Hpa II, а также маркер молекулярных весов ДНК Ledder 100-1000 bp (ЦНИИ Эпидемиологии, Москва). Результаты оценивали по наличию или отсутствию в геле после электрофореза фрагментов ДНК необходимого размера. Дополнительно размеры ампликонов определяли с помощью программы LabImage Version 2.6.

Сканированные гели анализировали в автоматическом режиме с использованием программы RFLPscan 3.12 из пакета программ Gene Profiler 4.03 (CSP Inc., USA).

При проведении статистической обработки использовали коэффициент корреляции Пирсона [7].

Кластерный анализ и графическое отображение матриц коэффициентов сходства проводили при помощи программы TreeCon for Windows v.1.3b. Коэффициент генетической дистанции определяли по формуле: ГДxy = 1 – 2·Nxy/(Nx + Ny), где Nxy – количество совпадающих положительных признаков у объектов «x» и «y», Nx – количество положительных признаков у объекта «x», Ny – количество положительных признаков у объекта «y». Группирование штаммов и построение дендрограмм проводили при помощи невзвешенного парно-группового метода UPGMA [12].

Сравнение аннотированных геномов проводили с помощью программы Artemis 8.0 (Sanger Institute, Англия). Анализ гомологичных нуклеотидных последовательностей, представленных в различных генетических базах данных сети интернет, проводили с использованием он-лайн ресурса BLAST.

Полученные результаты и их обсуждение. Изучение носительства стафилококков проводили у жителей, проживающих в различных районах города Волгограда (в восьми районах), который был разделен на три топодема. В северный топодем были включены Тракторозаводский и Краснооктябрьский районы, в центральный – Ворошиловский и Центральный, в южный – Советский, Кировский и Красноармейский.

Анализ полученных данных показал, что частота обнаружения стафилококков на слизистых оболочках передних отделов носовых ходов зависел от региона проживания. Так, в северном топодеме золотистый стафилококк обнаруживали у 52,7 % обследуемых, у жителей центральной части города частота носительства этого микроба составила 44,6 %. В наиболее неблагополучном южном цифры носительства достигали 55,1 %

С целью установления принадлежности штамма к определенному типу все выделенные культуры S. aureus были дифференцированы нами на резидентные и транзиторные с использованием математической модели дифференциации для ЭВМ. Полученные данные позволили оценить уровни резидентного бактерионосительства у практически здоровых людей.

В результате проведенных исследований было установлено, что топодемы, имеющие наибольшие показатели экологического неблагополучия, характеризовались высоким уровнем резидентного бактерионосительства. Показатели резидентного бактерионосительства у практически здоровых людей Волгограда в виде ранжированного ряда выглядели следующим образом: северный топодем – 44,7 %, южный – 42,9 %, центральный – 28,2 %. Минимальная величина – 17,1 % была установлена нами для контрольного Центрального района. Данное значение было принято за фоновый уровень бактерионосительства. На основе полученных данных был рассчитан коэффициент резидентного бактерионосительства для всех топодемов, который отражал соотношение уровня резидентного бактерионосительства у людей в исследуемой зоне и аналогичного показателя контрольной

(фоновой) зоны. Установлено, что в топодемах с высокой техногенной нагрузкой коэффициенты составили 2,61 (северный) и 2,51 (южный).

Полученные данные позволили говорить о том, что в г. Волгограде даже в топодемах с высоким уровнем техногенного воздействия ситуация не является критической, а скорее может быть расценена как угрожающая.

Анализ данных показал, что представили рода Staphylococcus обнаруживались у 79,0 % обследуемых, вегетируя в изучаемом биотопе с различной частотой. В среднем величина обсемененности составила lg 2,06 ± 0,04 КОЕ/см^2. Установлено, что для лиц, находящихся в терапевтическом профиле стационара характерна более высокая обсемененность стафилококками (48,85 %), чем в хирургическом (28,5 %), при этом наиболее часто стафилококки контаминировали полость носа медицинского персонала (32,2 % – 32 человека) со средней величиной микробной колонизации lg 2,14 ± 0,12 КОЕ/см^2, в то время как у пациентов данные микроорганизмы обнаружены в 16,3 % (13 человек) случаев с плотностью обсемененности lg 1,67 ± 0,06 КОЕ/см^2 ($p < 0,05$). Необходимо отметить, что стафилококки преобладали у старшего медицинского персонала (62,5 %), у среднего данный показатель составил 37,5 %.

Проведенный нами анализ генетических баз данных показал, что полногеномные последовательности ДНК штаммов золотистого стафилококка широко представлены в них и хорошо изучены. В зарубежной литературе отмечена высокая вариабельность геномов S. aureus, достигающая различий до 20 %. Причем большинство фрагментов ДНК золотистого стафилококка являются консервативными, однако несколько протяженных участков характеризуются низкой гомологией у различных штаммов [7, 8]. Факторы патогенности золотистого стафилококка детерминированы четырьмя интегрированными профагами и двумя обширными островами патогенности. Причем, профаги φNM1, φNM2, φNM3, φNM4 и острова патогенности играют центральную роль и в эволюции золотистого стафилококка [9]. В то же время, анализ полиморфизма двух больших островов патогенности различных штаммов показывает, что они были приобретены независимо от эволюционного пути стафилококкового геномов.

При анализе детерминант вирулентности штамма S. aureus Newman было выявлено 30 генов, отвечающих за патогенность золотистого стафилококка, которые имеют 3-4 основных типа организации [10].

Молекулярно-генетический анализ известных детерминант факторов патогенности золотистого стафилококка с определением их конкретной локализацией в геноме проведен нами с помощью программы Artemis 8.0 (Sanger Institute, Англия). Последующее сравнение с нуклеотидными последовательностями стафилококков, доступными в генетических базах данных сети интернет, проводили с использованием он-лайн ресурса BLAST.

В результате исследования островов патогенности *in silico* не выявлено выраженной гомологии генов, кодирующих факторы патогенности υSaα и υSaβ S. aureus с геномами коагулазонегативных стафилококков. Обнаружено лишь 85 % сходства с геном *guaA*, фланкирующего с 5' конца острова патогенности, со штаммами S. haemolyticus JCSC1435, S. saprophyticus ATCC 15305, S. carnosus TM300, S. pseudintermedius ED99, S. epidermidis RP62A, S. epidermidis ATCC 12228, S. pseudointermedius HKU10-03.

Частичная гомология острова патогенности υSaβ обнаружена с отдельными небольшими фрагментами ДНК коагулазонегативных стафилококков, с тРНК генами и геном *bsaF* у анализируемых штаммов S. haemolyticus JCSC1435, S. saprophyticus ATCC 15305, S. carnosus TM300, S. pseudintermedius ED99, S. epidermidis RP62A, S. epidermidis ATCC 12228, S. pseudointermedius HKU10-03. Более выраженной гомологией с отдельными фрагментами генома коагулазоотрицательных стафилококков обладали нуклеотидные последовательности, расположенные в профагах φNM1 и φNM3 S. aureus. Однако выявленная гомология также обнаружена лишь с непротяженными последовательностями генов.

Сравнение полных геномов Staphylococcus aureus разных штаммов, а также с геномами других видов стафилококков позволило выявить высокий уровень реарранжировки хромосомных ДНК. Кроме того, сравнение хромосом с использованием интернет ресурса BLAST (megablast) показал низкий уровень общей гомологии. ДНК различных штаммов S. aureus имели гомологию 91-98 %, в то время как ДНК других видов стафилококков имели сходство с золотистым стафилококком на уровне 22-30 %. Хромосомы 1-го штамма S. haemolyticus и 2-х штаммов S. epidermidis оказались гомологичны геному S. aureus на 30 %, а 2-х штаммов S. lugdunensis – на 25 и 26 %. ДНК S. saprophyticus оказалась гомологична геному золотистого стафилококка лишь на 22 %. Использование другого алгоритма сравнения геномов (blastn) позволило выявить более высокий уровень общей гомологии хромосом стафилококков, составляющий 60-70 %.

В связи с выявлением неожиданно низкого уровня общей гомологии хромосомной ДНК различных видов стафилококков было проведено сравнение геномов S. aureus, S. haemolyticus, S. epidermidis и S. lugdunensis с учетом их блочной реорганизации в программе MAUVE v.2.3.1.

Алгоритм, используемый в данной программе, позволил выделить гомологичные блоки ДНК исследованных штаммов стафилококков,

а также выявить уровень гомологии внутри каждого блока. Полученные данные свидетельствуют, что в хромосомах каждого анализируемого штамма выделено по 50-60 гомологичных блоков размерами от 200 до 200000 п.н. Характерно наличие большого количества блоков ДНК небольшого размера, а также многочисленных фрагменты геномов, не вошедших в гомологичные блоки. Кроме того, на протяжении гомологичных блоков содержится большое количество нуклеотидных замен, что визуализировано на схеме в виде обширных белых включений внутри цветных прямоугольников.

Отдельно хотелось бы отметить наличие большого количества фрагментов, присутствующих у одних видов стафилококков и полностью отсутствующих у других. Кроме того, обращает внимание очень сложный общий вид организации гомологичных блоков ДНК.

Сравнительное исследование геномов различных видов стафилококков, с учетом их блочной реорганизации, свидетельствовало о низкой общей гомологии хромосомной ДНК этих видов микроорганизмов.

Различия в геномной организации стафилококков нами обнаружены и при генотипировании штаммов Staphylococcus, выделенных из различных экологических ниш. Для дифференциации и генетического типирования штаммов нами был использован плазмидный анализ и метод амплификации с произвольными праймерами (RAPD).

С помощью плазмидного анализа 156 штаммов Staphylococcus spp. плазмидные репликоны обнаружены в 54 штаммах S. aureus, 12 штаммах S. cohnii, 9 штаммах S. xilosus, 9 штаммах S. simulans, 3 штаммах S. huicus, 3 изолятах S. lentus, 3 штаммах S. epidermidis, 6 штаммах S. capitis, 3 изолятах S. warneri и в 3 штаммах S. saprophyticus. Все обнаруженные плазмиды имели различную молекулярную массу. Их размер составлял от 2,5 . до 90 т.п.н.

Четкого распределения плазмид различного размера среди групп штаммов, изолированных от исследуемых пациентов, не обнаружено. Не выявлено корреляции между наличием плазмидных ДНК и географическим регионом выделения штаммов, так как плазмидсодержащие штаммы стафилококков были выделены из различных топодемов. Однако встречаемость штаммов S. aureus, содержащих плазмиды, была значительно выше среди пациентов лечебных учреждений. Все плазмидсодержащие изоляты золотистого стафилококка были полирезистентны к действию антибиотиков.

Типирование микроорганизмов на основе всего генома или нескольких генетических блоков является более эффективным подходом, однако требует выбора дифференцирующих регионов, представленных в геноме всех изучаемых штаммов. В связи с этим, для генотипирования изолятов рода Staphylococcus нами применен метод амплификации с произвольными (RAPD) и специфическими праймерами, являющихся фрагментами генов вирулентности.

При использовании праймеров, детектирующих фрагменты капсулярных генов, положительные результаты реакции амплификации получены со всеми изолятами S. aureus. Наличие в геноме гена *mecA,* детерминирующего устойчивость к β-лактамам, было подтверждено в реакции амплификации со специфическими праймерами лишь в 12 штаммах золотистого стафилококка, из которых 10 штаммов выделены от пациентов лечебных учреждений. Фрагменты гена стафилококкового энтеротоксина (*sea*) обнаружены в 40% изолятов. Со всеми штаммами золотистого стафилококка, обладающими гемолитической активностью получены положительные результаты реакции амплификации с праймерами, фланкирующими фрагменты α-гемолизина (*hla*).

Несмотря на то, что при использовании метода RAPD последовательности олигонуклеотидов выбираются произвольно, получаемая картина амплификации, как правило, является видо- и штаммоспецифичной. При этом количество сайтов связывания на одной и той же ДНК для праймеров одинаковой длины, но с разной первичной структурой может существенно варьировать. В результате при анализе продуктов амплификации ДНК в зависимости от праймера и штаммов на электрофореграммах визуализировались как общие, характерные для всех анализированных штаммов фрагменты, так и вариабельные ампликоны, на основе которых проводили кластерный анализ штаммов. С помощью произвольных праймеров удалось разделить все исследуемые штаммы микроорагнизмов рода Staphylococcus на 31 кластерную группу на уровне 90% гомологии, состоящих из двух и более штаммов, в зависимости от уровня сходства.

На основе нумерического анализа все исследуемые штаммы стафилококков разделены на 2 большие кластерные группы с уровнем сходства 60%. В одну кластерную группы вошли все штаммы S. aureus, а в другую гетерологичные виды микроорганизмов – коагулазонегативные стафилококки. Эти штаммы имели выраженное внутривидовое сходство между собой, но имели четкие генетические отличия со всеми исследуемыми штаммами S. aureus.

Штаммы золотистого стафилококка с идентичным спектром амплифицируемых фрагментов, содержали плазмиды одинакового размера. Наличие идентичных плазмид и RAPD-профилей отражало выраженное генетическое сходство данных штаммов (клональность изоля-

тов) и свидетельствовало о циркуляции в регионе идентичных штаммов S. aureus.

Штаммы КОС четко формировали уникальные группы из лечебных учреждений, которые не содержали штаммов, выделенных из других источников.

Используемый нами кластерный анализ позволил определить уровень гомологии исследуемых видов стафилококков по совокупности их амплификационных фрагментов в общей матрице сходства, что позволило оценить связи между изолятами и их экологическими особенностями штаммов.

Интересно отметить данные, полученные при генотипировании исследуемых КОС. Так, 12 штаммов S. cohnii, выделенные от больных из лечебного учреждения, имели весьма выраженную степень генетического родства, которая выражалась в сходстве картины амплификации фрагментов ДНК. Штаммы S. cohnii, выделенные с кожных покровов здоровых школьников, не входили в кластерную группу штаммов S. cohnii, выделенных в ЛПУ, т.е. имели уникальные генетические отличия.

Несмотря на различия в представлении кластерных групп, общая тенденция и степень родства исследуемых нами изолятов, совпадали с результатами зарубежных исследователей.

Согласно второму изданию «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology» (2009), род Staphylococcus перенесен из семейства Micrococcaceae во вновь созданное семейство Staphylococcaceae. Род включает более 30 видов бактерий. Количество Г + Ц пар в ДНК стафилококков варьирует в достаточно широком диапозоне – от 30 до 39 %. На основе гена 16S РНК и ДНК-ДНК гибридизации [13] эти микроорганизмы разбиты на 12 кластерных групп, причем S. aureus выделен в отдельную кластерную группу, отличающуюся от других видов стафилококков. На основе фенотипических данных род Staphylococcus разделен на коагулазопозитивные и коагулазонегативные виды стафилококков.

Итак, в данном разделе были дифференцированы все исследуемые штаммы и изоляты, а также показана выраженная генетическая гетерогенность стафилококков. Проведение генотипического анализа позволяет заключить, что все исследуемые популяции стафилококков имеют ряд генетических особенностей, выявляемых при помощи методов RAPD и плазмидного анализа. Не исключено, что появление новых данных об организации геномов стафилококков может в дальнейшем привести к рассмотрению таксономических особенностей различных видов внутри рода Staphylococcus.

Таким образом, изучение распространенности экологической детерминированности фенотипических и генотипических признаков стафилококков позволило говорить об изменениях микробиологических характеристик стафилококковой аутофлоры жителей г. Волгограда. Полученные данные дают возможность использовать микробиологические показатели в качестве маркеров состояния эколого-гигиенических аспектов бактерионосительства стафилококков в популяции людей, живущих в крупном промышленном городе

Список литературы

1. Блохина И.Н., Леванова Г.Ф. Геносистематика бактерий и ее природное значение // Успехи микробиологии. – М.: Наука, 1990. – Т. 24. – С. 3-25.

2. Вологина М.В. Колонизационная резистентность полости рта у детей с врожденной расщелиной твердого неба до уранопластики: дис. ... канд. мед. наук. – Волгоград, 2008. – 134 с.

3. Дерябин Д.Г. Стафилококки: экология и патогенность. – Екатеринбург: УрО РАН, 2000. – 263 с.

4. Лиманская И.В. Биолого-экологические аспекты персистенции эшерихий: дис. ... канд. мед. наук. – Волгоград, 2006. – 129 с.

5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: пер с англ. – М.: Мир, 1984. – 479 с.

6. Покателов А.А. Бактериальная колонизация и сукцессия у больных хирургических стационаров с различной экологической нагрузкой в условиях крупного промышленного города: дис. ... канд. мед. наук. – Волгоград, 2009. – 142 с.

7. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. – М.: Медиа Сфера, 2003. – 305 с.

8. Baba T., Bae T., Schneewind O., Takeuchi F., Hiramatsu K. Genome Sequence of Staphylococcus aureus Strain Newman and Comparative Analysis of Staphylococcal Genomes: Polymorphism and Evolution of Two Major Pathogenicity Islands // J. Bacteriol. – 2008. – Vol. 190, № 1. – P. 300–310.

9. Baba T., Takeuchi F., Kuroda M., Yuzawa H., Aoki K., Oguchi A., Nagai Y., Iwama N., Asano K., Naimi T., Kuroda H., Cui L., Yamamoto K., Hiramatsu K. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA // Lancet. – 2002. – Vol. 359. – P. 1819–1827.

10. Bae T., Banger A.K., Wallace A., Glass E.M., Åslund F., Schneewind O., Missiakas D.M. Staphylococcus aureus virulence genes identified by bursa aurealis mutagenesis and nematode killing // Proc. Natl. Acad. Sci. – USA. – 2004. – Vol. 101. – P. 12312–12317.

11. Jarraud S., Mougel C., Thioulouse J. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease // Infect. Immun. – 2002. – Vol. 70. – P. 631–641.

12. Sneath P.H., Sokal R.R. Numerical taxonomy: Principles and practice of numerical classification // San Francisco: Freeman. – 1973. – 573 p.

13. Takahashi T., Satoh I., Kikuchi N. Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus Staphylococcus based on 16S rRNA gene sequence analysis // Int J Syst Bacteriol. – 1999. – Vol. 49. – P. 725-728.

14. Verdier I., Geraldine Durand G., Bes M. et al. Identification of the capsular polysaccharides in S*taphylococcus aureus* clinical isolates by PCR and agglutination tests // J. Clin. Microbiol. – 2007. – Vol. 45, № 3. – P. 725–729.