

**О.П. Колесникова, О.Т. Кудяева, Е.В. Ненашева, И.А. Гольдина,
Е.В. Гойман, А.П. Лыков, И.В. Сафронова, В.Л. Лимонов,
А.Н. Мирскова, Е.В. Рудякова, К.В. Гайдуль**

СЕЛЕКТИВНЫЕ ИММУНОДЕПРЕССИВНЫЕ СВОЙСТВА НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛИЛ-ТИОАЛКАНКАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

ООО «АБОЛмед»

Иркутский институт химии им А.Е. Фаворского СО РАН

Показано, что соединение из ряда трис-(2-гидроксиэтил)аммониевых солей производных индолил-3-тиоуксусной кислоты представляет интерес как потенциальное лекарственное средство новой химической группы, способное селективно подавлять активность Th2 лимфоцитов. Иммуносупрессивные свойства соединения выявляются в экспериментальных моделях Th2-зависимой активации В-клеток (в модели Th2-опосредованного иммунокомплексного гломерулонефрита и модели IgM-ответа на Т-зависимый антиген у интактных мышей). Подавление активности Th2 клеток сопровождается девиацией в сторону Th1-зависимого иммунного ответа, что подтверждается данными о способности соединения поляризовать Th1/Th2 иммунный ответ в экспериментальной модели *in vivo* и изменением соотношения подклассов IgG, характерного для Th1-зависимого иммунного ответа. Соединение подавляет спонтанную и стимулированную экспрессию гена ИЛ-4 и стимулированную продукцию этого цитокина в мононуклеарных клетках крови здоровых лиц.

Ключевые слова: производные арилгетероалканкарбонновых кислот, селективный иммунодепрессант

Как известно, в основе патогенеза расстройств иммунитета лежит дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов, продуцируемых Th1 и Th2 лимфоцитами (соответственно превалирование клеточного или гуморального иммунного ответа). При аутоиммунных заболеваниях (рассеянный склероз, ревматоидный артрит) выявляется повышенная активность Th1 клеток, при системной красной волчанке, аутоиммунных васкулитах, некоторых видах анемий, аллергии — Th2 клеток. С учетом этих данных понятно, что иммуномодулирующая терапия при аутоиммунных заболеваниях должна включать препараты, понижающие активность Th1 клеток и повышающие активность Th2 клеток. Одним из направлений в иммуномодулирующей терапии аллергических заболеваний является применение препаратов, снижающих активность Th2 клеток и повышающих активность Th1 клеток, т.е. иммуномодуляторов. Однако в настоящее время нет препаратов, разрешенных к медицинскому применению, с селективной способностью изменять баланс Th1/Th2 в нужном направлении [5]. Сегодня в качестве селективных иммунотропных препаратов применяются только иммунодепрессанты циклоспорин А и зенапакс. Селективность действия этих препаратов заключается в подавлении активации Т-лимфоцитов и,

на клеточном уровне, антигензависимом образовании/высвобождении цитокинов (включая провоспалительный ИЛ-2) или в блокаде рецепторов к этому цитокину, что приводит к подавлению его биологической активности.

На основании скрининга иммуноактивных свойств новых соединений — производных арилгетероалканкарбонновых кислот — на интактных животных выявлены соединения с потенциальной способностью изменять баланс продукции про/противовоспалительных цитокинов соответственно Th1 или Th2 клетками. Выделена группа соединений — структурных аналогов трекрезана — солей 2-метилфеноксиуксусной кислоты с биогенными аминами (диметилэтаноломином, метилдиэтаноломином, диэтаноломином), способных активировать Th1 клетки. К соединениям, изменяющим активность Th2 лимфоцитов, отнесено соединение под шифром ВМ-7-02 ряда трис-(2-гидроксиэтил) аммониевых солей производных индолил-3-тиоуксусной кислоты, обладающее иммуносупрессивными свойствами (максимальное подавление миелопоэза, IgM ответа, иммуносупрессивные эффекты в культуре *in vitro* на спонтанную и митогенстимулированную пролиферацию клеток селезенки). При этом эффект подавления первичного IgM ответа соединением,

введенным в разные сроки относительно антигена, был различным. Целью настоящего исследования являлось изучение механизмов иммунодепрессивного действия соединения ВМ-7-02 при использовании других экспериментальных моделей, доз и схем его применения.

Методика

В работе использовали здоровых половозрелых животных — мышей линии DBA/2 и мышей гибридов (CBAxС57BL/6)F1 (CBF1), (C57BL/6xDBA/2)F1 (BDF1) обоего пола, 8-10 недельного возраста, массой тела 18-20 г. Разброс в группах по исходной массе тела не превышает $\pm 10\%$. Контрольные и опытные животные одного возраста и получены одновременно из одного питомника («Рассвет», г. Томск). До и в период эксперимента контрольные и опытные животные содержались в виварии в одинаковых условиях: в стандартных пластиковых клетках с мелкой древесной стружкой (не более 10 особей) на стандартном рационе. Все исследования проводились в одно и то же время суток (утром). Опыты проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных (Страсбург, 1986), и одобренными комитетом по биомедицинской этике ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН. Здоровые лица, включенные в исследование, были подвергнуты стандартному клинико-лабораторному обследованию (осмотр, общий анализ крови, исследование крови на маркеры гепатитов, ВИЧ, реакцию Вассермана). Данные параметры соответствовали нормальным значениям.

Соединение растворяли в среде RPMI и использовали в разных дозах относительно LD_{50} . Контрольным животным в таком же объеме и режиме вводили растворитель соединения (среда RPMI). Контрольные и опытные группы состояли не менее чем из 8-10 мышей.

Модель иммунокомплексного гломеруло-нефрита вызывали у самок B6D2F1 мышей двукратным, с недельным интервалом, внутривенным введением лимфоидных клеток от самок родительской линии DBA/2 [11]. Содержание белка в моче определяли колориметрически с красителем Kumsai brilliant blue (Loba Feinchemie) на Titertec Multiscan, длина волны λ 570 nm. В опытах использовали мышей со стойкой протеинурией и содержанием белка 3 мг/мл и более (белок в моче определялся неоднократно).

Количество IgM АОК в селезенке мышей оценивали на 4-е сутки после иммунизации по количеству зон локального гемолиза в полужидкой среде модифицированным методом [9]. Для иммунизации животных использовали эритроциты барана (ЭБ) в дозе 10×10^6 . Результаты выражали в абсолютном количестве IgM АОК в селезенке.

Количество IgG АОК определяли в селезенке на пике иммунного ответа (на 5-е сутки после вторичной иммунизации) методом локального гемолиза [14]. Клетки селезенки инкубировали 2 часа при 39 °С в камерах с ЭБ, комплементом морской свинки и кроличьей антисывороткой против мышиногo IgG (разведение в 2000 раз). Зоны гемолиза подсчитывали под увеличением $\times 42$. Результаты выражали в абсолютном количестве IgG АОК в селезенке. Для оценки влияния соединения на клеточный иммунный ответ использовали реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) [8]. Соединение вводили внутрибрюшинно одновременно с сенсибилизирующей дозой антигена (0,25% ЭБ в объеме 0,5 мл внутрибрюшинно) и далее в течение 4 суток ежедневно (включая день введения разрешающей дозы антигена). На 4-е сутки после сенсибилизации вводили разрешающую дозу антигена под подошвенный апоневроз правой задней лапы (50% ЭБ в объеме 50 мкл). В контрлатеральную лапу вводили растворитель (RPMI) в том же объеме. Контрольным животным в таком же объеме и режиме вводили растворитель соединений. Учет реакции производили через 24 часа после введения разрешающей дозы ЭБ, величину отека оценивали штангенциркулем. Результаты выражали в %.

Изучение экспрессии гена ИЛ-4 проводили методом обратнотранскриптазной полимеразной цепной реакции [12, 13]. Геномную РНК получали методом фенольной экстракции с использованием тест-системы ВектоРНК — экстракция (Вектор-Бест, Новосибирск) из мононуклеарных клеток крови, культивированных в течение 24 часов [7]. Амплификацию полученной ДНК осуществляли с использованием пар олигонуклеотидных праймеров, гомологичных консервативным участкам антипараллельных цепей ДНК, в программируемом амплификаторе «Терцик» (ДНК — технологии, Москва). Продукты амплификации анализировали методом электрофореза в 2% геле агарозы с добавлением бромистого этидия (ВектоДНК — ЭФ, Вектор-Бест, Новосибирск). При амплификации с праймерами β -актина и последующей электрофоретической оценке результатов все образцы периферической крови здоровых лиц демонстрировали наличие фрагмента соответствующего размера (462 п.н.). Полученный сегмент ДНК выявляли в виде дискретной полосы после электрофоретического разделения молекул ДНК. Положительными считали образцы с наличием в геле видимой полосы ДНК с размером, соответствующим ожидаемому (ИЛ-4 — 224 п.н.).

Полученные данные обрабатывали по непараметрическому критерию U Манна-Уитни (Гублер Е.В., 1978).

Результаты

Изучение иммуносупрессорных свойств соединения ВМ-7-02 *in vivo* проводили на экспериментальной модели реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) — индуцированного иммунокомплексного гломерулонефрита — Th2-зависимой модели аутоиммунного заболевания, при котором иммунологический механизм опосредован активацией и преобладанием Th2 лимфоцитов и соответствующих цитокинов (в первую очередь ИЛ-4), поликлональной активацией В-лимфоцитов, сопровождающейся увеличением синтеза аутоантител широкого спектра (в том числе анти-ДНК антител), формированием иммунных комплексов, что приводит к системному иммунокомплексному воспалительному процессу в почках — нефриту и протеинурии. Такой тип повреждения почек сравним морфологически и функционально с системной красной волчанкой у человека [6].

Проведено 3 серии опытов. В I серии мышам со стабильной протеинурией на протяжении двух месяцев и содержанием белка в моче от 3,0 до 6,5 мг/мл проведено курсовое введение соединения: 5 ежедневных внутривентральных инъекций в дозе 300 мг/кг. Установлено, что через 5 дней после последнего введения соединения в 83% случаев наблюдается достоверное снижение протеинурии: в среднем в группе до лечения протеинурия была равна 5,1 мг/мл, после лечения — 3,6 мг/мл ($P < 0,05$). Во II серии опытов соединение в дозе 5 мг/кг вводили *per os*, курс составил 10 введений. Аналогичным образом вводили препарат сравнения азатиоприн в дозе 5 мг/кг. Измерение протеинурии проводили через сутки после последнего введения препаратов. Под влиянием азатиоприна в 40% случаев наблюдается незначительное снижение белка в моче (в среднем на 8%), соединение вызывает снижение протеинурии в 80% случаев, снижение протеинурии в среднем под действием соединения составляет 41%. В III серии опытов соединение в дозе 10 мг/кг (200 мкг/мышь) вводили *per os*, курс составил 10 введений. Аналогичным образом вводили препарат сравнения азатиоприн в дозе 5 мг/кг. Измерение протеинурии проводили через сутки после последнего введения препаратов. в 83% случаев под влиянием азатиоприна снижается протеинурия (в среднем снижение составило 55%). Под влиянием соединения в 80% случаев наблюдается снижение протеинурии, в среднем снижение составило 42%. Анализируя полученные данные, можно заключить, что соединение вне зависимости от дозы и способа введения в 80% случаев (общее количество мышей с гломерулонефритом — 16) приводит к снижению белка в моче. При сравнении соединения ВМ-7-02 и азатиоприна по токсичности можно отметить, что соединение вызывает им-

мунодепрессивный эффект в дозе на порядок ниже относительно LD50, чем азатиоприн. По данным морфологического исследования, применение и азатиоприна, и соединения ВМ-7-02 приводит к уменьшению выраженности структурных изменений гломерул, тубулярной альтерации, интерстициального гемосидероза, а также мононуклеарной инфильтрации. Соединение ВМ-7-02 по сравнению с азатиоприном приводит к максимальному уменьшению мононуклеарной клеточной инфильтрации, исчезновению геморрагического синдрома и появлению тенденции к регенерации эндотелиоцитов капилляров клубочков. И цитостатик (азатиоприн), и исследуемое соединение снижают активацию иммунной системы преимущественно на уровне В-клеточного звена. В целом по эффективности соединения не уступает широко используемому в клинической практике иммунодепрессанту азатиоприну, а в некоторых отношениях превосходит его [2].

Подтверждением иммуносупрессорного эффекта соединения, т.е. его способности подавлять Т-зависимую активацию В-клеток являются данные, полученные на интактных мышах в модели первичного гуморального иммунного ответа. Известно, что иммунизация интактных мышей Т-зависимым антигеном — эритроцитами барана приводит также к активации *in vivo* В-клеток и последующему синтезу антител в селезенке. Для первичного IgM ответа соединение в дозах 1, 5, 10 мг/кг вводили одновременно с антигеном и далее в течение 3-х суток ежедневно. Соединение вводили внутривентрально или внутривентриально. Для вторичного IgG ответа соединение в дозах 1, 5, 10 мг/кг вводили одновременно с первичной внутривентральной иммунизацией 0,25% ЭБ в объеме 0,5 мл и далее в течение 3-х суток ежедневно. Соединение вводили внутривентрально. Через 30 дней после первичной иммунизации проводили вторичную иммунизацию ЭБ в дозе 10×10^6 /мышь внутривенно.

Как видно из данных *таблицы 1*, вне зависимости от способа введения соединения (внутрижелудочно или внутривентрально) наблюдается дозо-

Таблица 1
Влияние соединения ВМ-7-02 на первичный и вторичный гуморальный иммунный ответ

Группы	Число IgM АОК / селезенку		Число IgG АОК/селезенку
	Внутрижелудочно	Внутривентрально	Внутривентрально
Контроль	6024	9620	26140
Соединение:			
1 мг/кг	6761	5843	28067
5 мг/кг	2925*	5508	39814
10 мг/кг	2112*	3111*	41687*

Примечание: * — достоверно относительно контроля, $P < 0,05$

Частота развития *lupus*-нефрита (%) и концентрация белка в моче (мг/мл)
у реципиентов с хронической РТПХ

Группа	Через 2 месяца		Через 3 месяца	
	Частота	Белок	Частота	Белок
хРТПХ	22,2 (2/9)	1,4	33,3 (3/9)	2,2
хРТПХ+ВМ-7-02	14,3 (1/7)	1,1	16,7 (1/6)	1,6

зависимое подавление первичного гуморального иммунного IgM ответа. При использованном режиме введения соединения выявляется дозозависимая стимуляция вторичного гуморального иммунного IgG ответа. Соединение в дозах 1, 5, 10 мг/кг не оказывает влияния на выраженность клеточного иммунного ответа, оцененного в тесте ГЗТ.

Ранее показано, что индукция хронической РТПХ в полуаллогенной системе (перенос лимфоидных клеток от родителя→F1 гибридам) приводит наряду с Th2-зависимым вариантом иммунопатологии (*lupus*) к появлению у части мышей Th1-зависимого варианта (*nonlupus*). Варианты иммунопатологии кроме клинических отличий (наличие или отсутствие протеинурии) имеют различия в параметрах клеточного и гуморального иммунного ответа, функциональных свойств В-лимфоцитов (изменение соотношения подклассов иммуноглобулинов). Мыши с Th1-вариантом характеризуются сниженным соотношением IgG1/IgG2a, тогда как у мышей с Th2-вариантом иммунопатологии наблюдается его увеличение, возрастающее по мере развития заболевания [4]. В лаборатории разработана оригинальная экспериментальная модель, позволяющая в условиях *in vivo* оценивать возможность доминирования Th1 или Th2 иммунного ответа под действием препаратов, физических тренировок. Установлено, что с помощью агентов, специфически активирующих Th1 или Th2 клетки, возможна модуляция течения РТПХ в полуаллогенной системе и изменение частоты вариантов иммунопатологии [1]. Испытывали влияние соединения ВМ-7-02 на возможность модуляции течения хронической РТПХ: реципиентам за 3 дня до начала индукции РТПХ и спустя 2 недели после переноса клеток селезенки родителя вводили соединение в дозе 10 мг/кг. Определение протеинурии проводили через 2 и 3 месяца после индукции хронической РТПХ. Данные представлены в таблице 2.

Таким образом, соединение ВМ-7-02 снижает число реципиентов *lupus*⁺, что, по-видимому, изменяет баланс Th1/Th2 в сторону Th1-клеток.

Изучение соотношения подклассов IgG подтверждает это предположение: под влиянием соединения ВМ-7-02 наблюдается увеличение концентрации IgG2a и, соответственно, изменение соотношения IgG1/IgG2a в сторону IgG2a. У мышей *nonlupus* от 2,08 до 1,63 и у мышей *lupus* от

2,76 до 2,0, т.е. в сторону Th1-зависимого подкласса IgG2a, что согласуется с ранее выявленными иммуноактивными свойствами этого соединения — способностью ингибировать Th2 ответ.

Таким образом, используя параметр соотношения подклассов иммуноглобулинов IgG1/IgG2a в сыворотке как интегральный показатель доминирования Th1/Th2 лимфоцитов, можно заключить, что соединение ВМ-7-02 обладает способностью изменять баланс про- и противовоспалительных цитокинов, соответственно синтезированных Th1 или Th2-лимфоцитами в направлении Th1 (Рис. 1).

По данным [10], в модели Th2-зависимого варианта иммунопатологии (*lupus*) ИЛ-4 — основной цитокин, ответственный за активацию В-клеток. Проведено изучение влияния соединения ВМ-7-02 в дозе 30, 100, 300 мкг/мл на экспрессию гена ИЛ-4 и продукцию цитокина ИЛ-4 в мононуклеарные клетки крови (МНК) периферической крови человека. Установлено, что соединение ВМ-7-02 в культуре нестимулированных МНК человека вызывает подавление экспрессии гена ИЛ-4 во всех исследованных дозах, в культуре стимулированных липополисахаридом *E. coli* 011:В4 МНК соединение вызывает подавление экспрессии ИЛ-4 в дозах 100 мкг/мл и 300 мкг/мл. Соединение во всех испытанных дозах не влияет на спонтанную продукцию ИЛ-4, ФГА-стимулированная продукция этого цитокина подавляется в дозах 100 и 300 мкг/мл. Отличия в действии соединения на спонтанную экспрессию гена ИЛ-4 и спонтанную продукцию этого цитокина могут быть связаны с тем, что мРНК, очевидно, всех цитокинов следует относить к короткоживущим, нестабильным (достаточно выраженная времен-

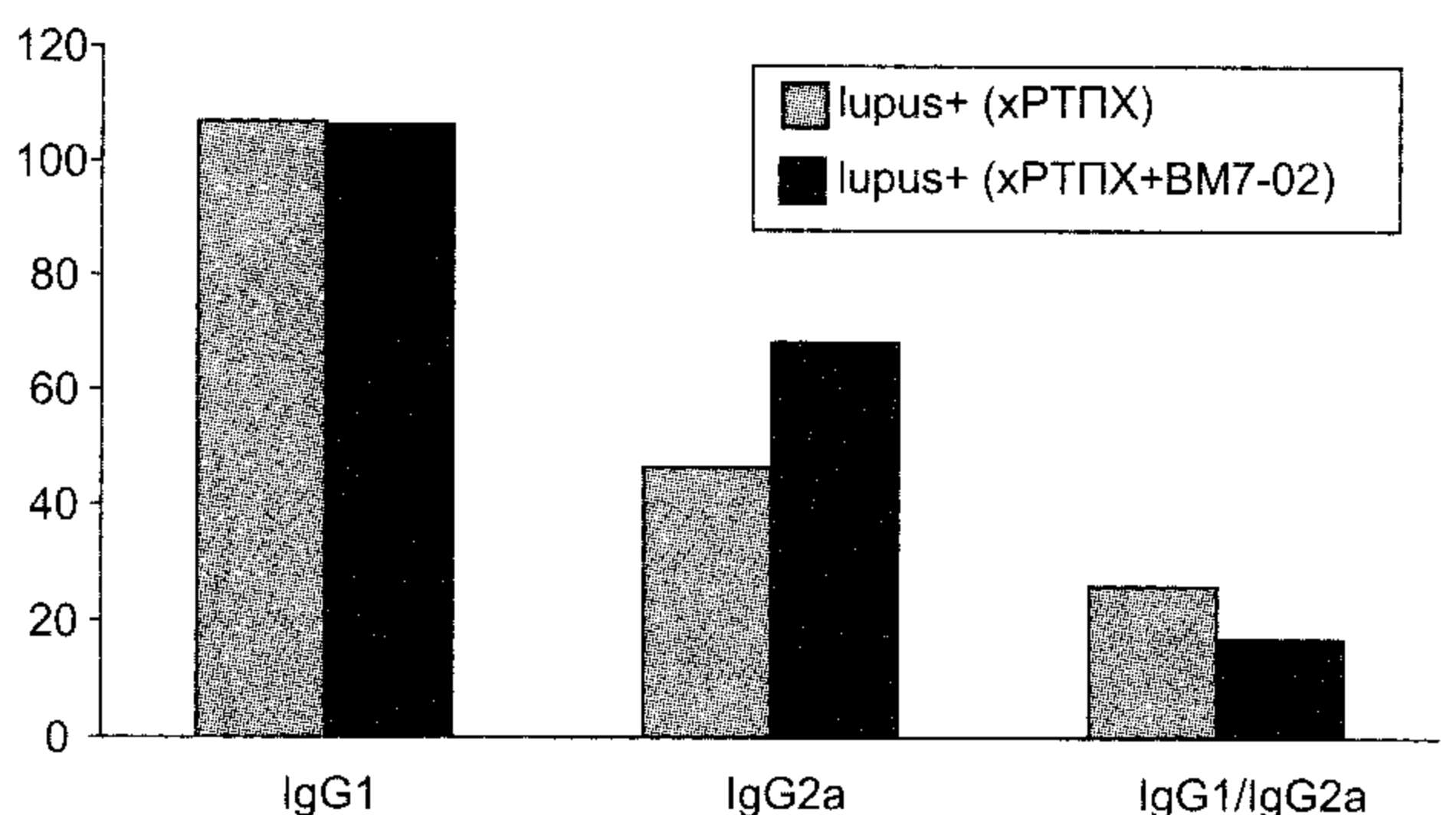


Рис. 1. Влияние соединения ВМ-7-02 на содержание IgG разных подклассов

ная мобильность) в отличие от рибосомальных и транспортных РНК, относящихся к стабильным молекулам [3].

Заключение

В настоящем исследовании получены данные об иммуносупрессорных свойствах соединения из ряда трис-(2-гидроксиэтил) аммониевых солей производных индолил-3-тиоуксусной кислоты в экспериментальных моделях Th2-зависимой активации В-клеток (в модели Th2-опосредованного иммунокомплексного гломерулонефрита и модели IgM-ответа на Т-зависимый антиген у интактных мышей). Не обнаружено какого-либо иммуноактивного эффекта соединения на клеточные реакции иммунитета — ГЗТ у интактных мышей. Подавление активности Th2 клеток сопровождается девиацией в сторону Th1-зависимого иммунного ответа. Возможно, селективность иммуносупрессии в экспериментальных моделях связана с избирательным подавлением продукции ИЛ-4 в Th2-лимфоцитах: соединение подавляет спонтанную и стимулированную экспрессию гена ИЛ-4 и стимулированную продукцию этого цитокина в мононуклеарных клетках крови здоровых лиц.

A SELECTIVE IMMUNOSUPPRESSIVE PROPERTIES OF THE NEW DERIVATIVE OF ARYLHETEROALKANECARBOXYLIC ACIDS

O.P. Kolesnikova, O.T. Kudaeva, E.V. Nenasheva, I.A. Goldina, E.V. Goiman, A.P. Lykov, I.V. Safronova, V.L. Limonov, Mirskova A.N., E.V. Rudyakova, K.V. Gaidul

On the grounds of screening of immunoactive characteristic of the original joining the class with arylheteroalkanecarboxylic acid the compound 1-benzylindol-3-ylthioacetate tris-(2-hydroxyethyl)ammonium salt, is selected as potential medicinal facility of the new chemical group, capable selectively to suppress the activity of the Th2 and hereunder change the balance Th1/Th2. Immunosuppressive characteristics of the join are revealed in experimental models of T-mediated activation of B-cells (model of Th2-mediated immune complex-dependent glomerulonephritis and model IgM-response to T-dependent antigen into normal mice). On the models of chronic GVHD it is installed: the join reduces the relative number of recipient-lupus that can be indicative of its abilities to change the balance Th1/Th2 in direct to Th1. The study of the correlation subclass of IgG confirms this suggestion: there are the correlation IgG1/IgG2a from 2.76 in checking before 2.00 under influence of the join that is to say aside Th1-dependent subclass of IgG2a. The acknowledgement about abilities of the join in vivo to polarize Th1/Th2 is given about its efficiency and for correcting already developed Th2-dependent pathology lupus-nephritis. It is installed that the join, possessing suppressing effect through

activation of the B-system of immunity, suppresses the expression mRNA gene of IL-4 and spontaneous/stimulated production of IL-4 by MNC from donors in vitro.

Литература

1. Влияние препаратов, изменяющих соотношение Th1/Th2, на частоту развития клинических вариантов хронической реакции трансплантат против хозяина / О.Т. Кудяева, Е.В. Гойман, А.П. Лыков и др. // Бюлл. экспер. биологии и медицины. — 2005. — Т. 140. — №9. — С. 325-327.
2. Морфологическое исследование почек и селезенки у мышей с иммунокомплексным гломерулонефритом, интактных и на фоне иммуносупрессивной терапии / В.Л. Лимонов, А.В. Шурлыгина, М.В. Робинсон и др. // Бюл. СО РАМН. — 2005. — №2 (116). — С. 50-54.
3. Система цитокинов. Теоретические и клинические аспекты / В.А. Козлов. — Новосибирск. — 2004. — С. 23-37.
4. Th1- и Th2-зависимые варианты хронической реакции трансплантат против хозяина / В.А. Козлов, О.Т. Кудяева, О.П. Колесникова и др. // Иммунология. — 2002. — №3. — С. 143-146.
5. Хаитов Р.М. Иммуномодуляторы: механизм действия и клиническое применение / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин // Иммунология. — 2003. — № 4. — С. 196-203.
6. Appleby P. Murine chronic graft-versus-host disease as model of systemic lupus erythematosus: Effect of immunosuppressive drugs on disease development / P. Appleby, D.G. Webber, J.G. Bowen // Clin. and Exp. Immunol. — 1989. — Vol. 78. — №3. — P. 449-453.
7. Chomczynski P. Singlestep method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanatephenolchloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // Analyt. Biochem. — 1987. — Vol. 162. — P. 156-159.
8. Crowle A.J. Delayed hypersensitivity in the mouse / A.J. Crowle // Adv. Immunol. — 1975. — № 20. — P. 197-264.
9. Cunningham A.J. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells / A.J. Cunningham, A. Szenberg // Immunology. — 1968. — Vol. 14. — №4. — P. 599-600.
10. Hyper IgE in stimulatory graft-versus-host disease: role of interleukin-4 / J-M. Doutrelepont, M. Moser, O. Leo et al. // Clin. Exp. Immunol. — 1991. — Vol. 83. — № 1. — P.133-136.
11. Kimura M. Specificity of anti-nuclear antibodies induced in F1 mice undergoing the graft versus host reaction: isotypes and cross-reactivities / M. Kimura, K. Shimada, Y. Kanai // Clin. Exp. Immunol. — 1987. — Vol. 69. — №2. — P. 385-393.
12. Roth M.J. Purification and characterization of murine retroviral reverse transcriptase expressed in Escherichia coli / M.J. Roth, N. Tanese, S.P. Goff // J. Biol. Chem. — 1985. — Vol. 260. — P. 9326-9335.
13. Sambrook J. Molecular cloning: a Laboratory manual / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. — New York: Cold Spring Harbor, 1989. — 532 p.
14. Sterzl J. Detection of cells producing 7S antibodies by the plaque technique / J. Sterzl, I. Riha // Nature. — 1965. — Vol. 208. — №13. — P. 858-859.