

Т. М. Муратова

ДИНАМІКА ВМІСТУ ЛЕПТИНУ І ПРОДУКУВАННЯ ІНТЕРЛЕЙКІНУ-1 МОНОНУКЛЕАРНИМИ КЛІТИНАМИ КРОВІ У ХВОРИХ НА ЕПІЛЕПСІЮ ЗА РІЗНИХ УМОВ ЛІКУВАННЯ

Т. Н. Муратова

Динамика содержания лептина и продукции интерлейкина-1 мононуклеарными клетками крови у больных эпилепсией в различных условиях лечения

Т. М. Muratova

Dynamics of leptin level and production of interleukin-1 by mononuclear blood cells in patients with epilepsy under different conditions of treatment

У пацієнтів з комплексною парціальною епілепсією із вторинними генералізованими судомами вміст лептину в сироватці крові після впливу транскраніальними магнітними стимуляціями (ТМС) на зону мозочка був вищим на 41,5 % порівняно до вихідного рівня ($P < 0,05$). Дослідження здатності мононуклеарних клітин крові до продукування інтерлейкіну-1 засвідчило, що при тривалості інкубації з бактеріальним ліпополісахаридом 1,5 години кількість бластних клітин у хворих на епілепсію збільшувалася в 4,1 рази (до $235,7 \pm 21,6$ %), порівняно до такого, яке реєструвалось в групі практично здорових — $57,2 \pm 4,9$ % ($P < 0,05$). Під час застосування лікування з використанням леветирацетаму (три тижні), нікотинаміду (протягом 1 тижня) та ТМС і за умов 1,5-годинної інкубації кількість бластних клітин достовірно зменшувалася порівняно до показника із використанням леветирацетаму (протягом чотирьох тижнів) з нікотинамідом (два тижні) ($P < 0,05$).

Ключові слова: епілепсія, імунологічна реактивність, лептин, транскраніальна магнітна стимуляція, леветирацетам, нікотинамід

У пациентов с комплексной парциальной эпилепсией и вторичными генерализованными судорогами содержание лептина в сыворотке крови после транскраниальных магнитных стимуляций (ТМС) зоны мозжечка было выше на 41,5 % в сравнении с исходным значением ($P < 0,05$). Исследование способности мононуклеарных клеток крови продуцировать интерлейкин-1 показало, что при длительности инкубации с бактериальным липополисахаридом 1,5 часа количество бластных клеток у больных эпилепсией возрастало в 4,1 раза (до $235,7 \pm 21,6$ %) в сравнении с таковым, которое регистрировалось в группе практически здоровых — $57,2 \pm 4,9$ % ($P < 0,05$). При лечении с применением леветирацетам (три недели), никотинамида (в течение 1 недели) и ТМС и в условиях 1,5-часовой инкубации количество бластных клеток достоверно уменьшалось в сравнении с таковым при применении леветирацетам (на протяжении четырех недель) и никотинамида (две недели) ($P < 0,05$).

Ключевые слова: эпилепсия, иммунологическая реактивность, лептин, транскраниальная магнитная стимуляция, леветирацетам, никотинамид

The level of leptin in blood serum in patients with complex partial epilepsy with secondarily developed generalized seizures exceeded that one registered before transcranial magnetic stimulation (TMS) of cerebellum by 41.5 % ($P < 0.05$). The number of blood mononuclear cells transformed into blast cells, which was the marker for ability to produce interleukine-1, and which was determined in epileptic patients under conditions of incubation of blood mononuclears with bacterial lipopolysaccharide during 1.5 hour exceeded that one in practically health persons by 4.1 times (rised up to 235.7 ± 21.6 % from 57.2 ± 4.9 % in control, $P < 0.05$). The treatment with levetiracetam (three weeks), nicotinamid (one week) and TMS caused significant decrease the number of blast cells under condition of 1.5 hour incubation; their number was less when compared with such one in group treated with levetiracetam during four weeks combined with nicotinamid (two weeks) ($P < 0.05$).

Keywords: epilepsy, immunological reactivity, leptin, transcranial magnetic stimulation, levetiracetam, nicotinamid

Лептин є гормоном, який секретують адипоцити пропорційно до загальної маси жирової тканини і який зв'язується з рецептором лептину (LepRb), що має своїм наслідком регулятивні впливи на широкий спектр показників енергетичного гомеостазу [3, 4]. Генетичні делеції з втратою рецепторів LepR супроводжуються гіперфагією та ожирінням [6, 13], в той час як відновлення функціонального стану нейрональних LepRb у мишей зі спадковим дефіцитом LepR відновлює масу тіла та кількість споживаної їжі [6, 13], що вказує на ключове значення центральних рецепторів LepRb в регуляції енергетичного обміну. Встановлено протиепілептичне значення гормону [5].

До останнього часу не було проведено досліджень особливостей вмісту лептину за різних умов лікування хворих на епілепсію. З іншого боку, індукцію лептину спричиняє інтерлейкін-1 [11, 12], який в свою чергу здатен полегшувати розвиток епілептичної активності [3, 5].

Тому метою роботи було вивчення вмісту лептину, а також здатності мононуклеарних клітин крові до продукування інтерлейкіну-1 (ІЛ-1) у хворих на епілепсію за різних умов.

У дослідженні спостерігали 21 пацієнти віком від 7 до 24 років, у яких було діагностовано комплексні парціальні судоми з вторинними генералізованими судомами (G 40.2). В усіх пацієнтів судоми мали характер резистентності — було зареєстровано в анамнезі щонайменше дві спроби застосування з лікувальною метою сучасних протиепілептичних препаратів, які не дали задовільного результату. Всі дослідження проведені у відповідності до вимог наказу МОЗ України № 281 від 01.11.2000 р. і схвалені комісією з біоетики Одеського національного медичного університету.

Транскраніальні магнітні стимуляції (ТМС) проводили за допомогою приладу «Нейро МС/Д» («Нейрософт», зареєстрований в Україні). Самостійні впливи ТМС здійснювали в термін з моменту відміни попереднього фармакологічного лікування і до призначення леветирацетаму (ЛВР) (до 8 діб), щодобово однократно при частоті імпульсів 5 Гц, індукції до 2 тесли та тривалості впливу 10 с.

Методика прийому леветирацетаму (UCB Pharma S.A., Belgium) складалася з двохкратного щодобового прийому препарату, починаючи з дози 250 мг (віком до 12 років) і 500 мг (віком від 12 років) на один

приєм і поступового збільшення дози препарату до 1500—2000 мг двічі на добу [2]. Під час визначення індивідуальної дози препарату виходили із рекомендацій застосування у дітей вищих доз — до 60 мг/кг/добу і вище, оскільки для дитячого віку є характерним інтенсивніший метаболізм [2]. В усіх випадках у пацієнтів спостерігалась добра переносимість препарату, хоча у двох дітей реєструвалась підвищена стомлюваність, сонливість і ще у двох — зниження апетиту та блювота.

Нікотинамід (5,0 % розчин) застосовували в дозі 10,0 мг двічі на добу внутрішньом'язово, дотримуючись рекомендацій, які обмежують загальну добову дозу препарату у дітей в залежності від віку [2].

Вміст лептину вимірювали в сироватці крові, яку забирали з ліктьової вени натщесерце за допомогою методу твердофазного імуоферментного аналізу ELISA із використанням антитіл до лептину людини ("Millipore, St. Charles", США), який проводили на базі лабораторії Університетської клініки. Сироватку крові зберігали при -80°C. Чутливість методу складала 0,135 нг/мл. Зважаючи на залежність вмісту лептину від наявної кількості жирової тканини, відбирали пацієнтів, у яких індекс маси тіла не перевищував 0,27 кг/м² [4].

Функціональний стан мононуклеарних клітин крові — їхню здатність до продукування інтерлейкіну-1 визначали за [1].

Отримані результати обробляли із використанням загальноприйнятих в медико-біологічних дослідженнях статистичних процедур.

Динаміка вмісту лептину. Отримані результати засвідчили, що на тлі застосування ЛВР разом з нікотинамідом вміст лептину підвищувався порівняно до вихідного рівня на 22,6 % ($P > 0,05$), в той час як при застосуванні лише ТМС збільшення складало 41,5 % ($P < 0,05$). При одночасному застосуванні лікувальних чинників підвищення порівняно до вихідного рівня складало 33,0 % ($P < 0,05$) (табл.).

Динаміка вмісту лептину у хворих на епілепсію за різних умов лікування, ($M \pm m$)

Умови лікування	Вміст лептину, нг/мл
До початку лікування ($n = 15$)	18,3 ± 1,2
Застосування ЛВР та нікотинамід (n = 10)	22,4 ± 1,7
ТМС зони мозочка (n = 10)	25,9 ± 2,9*
Одночасне застосування ЛВР, нікотинамід та ТМС (n = 11)	24,3 ± 2,1
Контроль (практично здорові) (n = 12)	19,3 ± 1,5

Примітка: * — $P < 0,05$ порівняно до показника, який реєструвався до початку лікування (метод ANOVA + Newman-Keuls тест)

Динаміка продукування інтерлейкіну-1 мононуклеарними клітинами крові. В групі пацієнтів з традиційним лікуванням при тривалості інкубації з ліпополісахаридом (ЛПС) на протязі 0,5 години спостерігалась виразна тенденція до стимуляції реакції бласттрансформації лімфоцитів — кількість бластних клітин складала 25,7 ± 2,8 %, а в групі порівняння — 22,4 ± 3,1 % ($P > 0,05$)

(рис. 1). Збільшення тривалості інкубації втричі (до 1,5 години) мало своїм наслідком підвищення досліджуваного показника (до 235,7 ± 21,6 %), тобто в 4,1 рази порівняно до такого, який реєструвався в групі практично здорових, — 57,2 ± 4,9 % ($P < 0,05$).

Визначення досліджуваного показника в групі дітей, яким здійснювали лікування із використанням лише ЛВР, показало, що за умови 1,5-годинної інкубації з ЛПС кількість бластних клітин складала 172,4 ± 15,7, що в 3,2 рази перевищувало відповідний показник, який зареєстровано в групі практично здорових, — 53,1 ± 5,1 % ($P < 0,05$). Причому досліджуваний показник був достовірно меншим ніж такий, що спостерігався у дітей із традиційним лікуванням за умови 1,5-годинної інкубації (на 63,7 %, $P < 0,05$) (рис. 1, III). Під впливом лише ТМС зони мозочка кількість бластних клітин перевищувала показник в групі контролю в 3,6 рази ($P < 0,05$) (рис. 1, IV). В той же час, при поєднаному застосуванні ЛВР та ТМС мозочка досліджуваний показник перевищував такий в групі контролю на 48,1 % ($P < 0,05$) (рис. 1, V) і при цьому був достовірно меншим як у порівнянні до групи пацієнтів з традиційним лікуванням (в 2,2 рази, $P < 0,05$), так і у порівнянні до показника в групі пацієнтів із використанням лише ЛВР — на 64,7 % ($P < 0,05$).

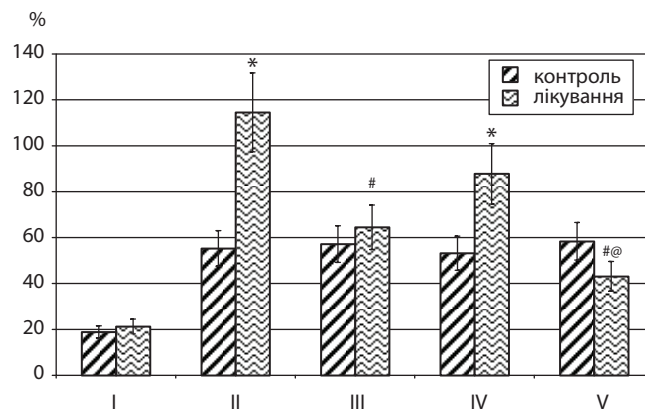


Рис. 1. Вплив окремого застосування традиційного лікування та леветирацетаму у комбінації з ТМС зони мозочка на ІЛ-1-продукуючу активність мононуклеарних клітин крові

Умовні позначення: I і II — показники в групі дітей з традиційним лікуванням при тривалості інкубації відповідно — 0,5 та 1,5 години; III — показники у дітей з використанням лише ЛВР, IV — лише ТМС зони мозочка і V — поєднаного застосування ТМС та ЛВР при тривалості інкубації 1,5 години.

Вісь ординат — кількість бластних клітин в % до загальної кількості мононуклеарних клітин, яку було прийнято за 100 %. * — $P < 0,05$ порівняно до показника в групі контролю; # — $P < 0,05$ порівняно з показником до лікування (ANOVA + Newman-Keuls тест); @ — $P < 0,05$ порівняно до показника у дітей з використанням лише ЛВР

В групі пацієнтів із застосуванням ЛВР у комбінації з нікотинамідом наприкінці першого тижня застосування нікотинамідом та відповідно третього тижня з початку використання ЛВР за тривалості інкубації з ЛПС на протязі 0,5 години кількість бластних клітин складала 21,3 ± 3,1 % і не відрізнялась від аналогічного показника в групі порівняння (практично здорові), в якій цей показник дорівнював 18,9 ± 2,7 % ($P > 0,05$) (рис. 2, I).

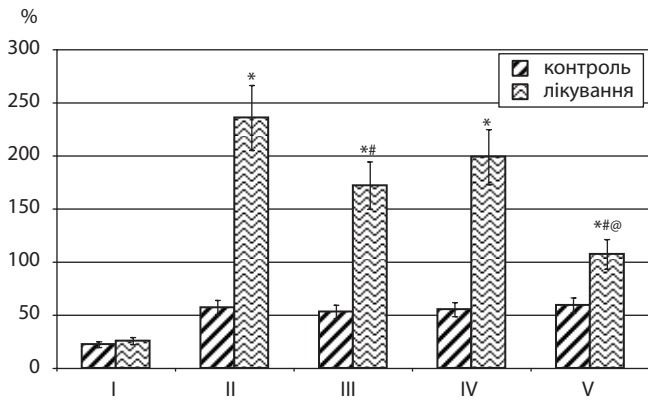


Рис. 2. Вплив леветирацетаму та нікотинаміду

на ІЛ-1-продукуючу активність мононуклеарних клітин крові

Показники в групі дітей: I і II — з комбінованим використанням ЛВР протягом 3 тижнів та нікотинаміду протягом 1 тижня, тривалість інкубації — 0,5 та 1,5 г відповідно; III — з використанням ЛВР протягом 1 місяця та нікотинаміду на протязі 2 тижнів, тривалість інкубації — 1,5 г; IV — ТМС при тривалості інкубації 1,5 г; V — ЛВР з нікотинамідом протягом 1 тижня на тлі ТМС та інкубація тривалістю 1,5 години

* — $P < 0,05$ — порівняно з показником в групі контролю; # — $P < 0,05$ — порівняно з показником в групі із трьохтижневим і @ — $P < 0,05$ — чотиритижневим застосуванням ЛВР з нікотинамідом (ANOVA ± Newman-Keuls тест)

Більш тривала інкубація з ЛПС (1,5 г) засвідчила чітку здатність спричиняти проліферацію лімфоцитів у відповідь на вплив субоптимальної дози поліклонального мітогену фітогемаглютинін — кількість бластних клітин склала $114,6 \pm 12,0 \%$, що в 2,1 рази перевищувало відповідний показник, який було зареєстровано в групі практично здорових ($55,3 \pm 5,1 \%$), $P < 0,05$ (рис. 2, II). Наприкінці лікування (1 місяця застосування ЛВР та 2 тижні — нікотинаміду) відповідні показники в групах з лікуванням та в контролі склали $64,5 \pm 5,2 \%$ та $57,2 \pm 4,9 \%$ ($P > 0,05$) (рис. 2, III). При застосуванні лікування з використанням ЛВР (три тижні), нікотинаміду протягом тижня та ТМС і за умов 1,5-годинної інкубації кількість бластних клітин достовірно зменшувалась порівняно як до показника із використанням ЛВР протягом 1 тижня ($P < 0,05$), так і порівняно до показника із використанням ЛВР (протягом чотирьох тижнів) з нікотинамідом (два тижні) ($P < 0,05$) (рис. 2, IV). При цьому відсутніми були достовірні відмінності від показника в групі контролю ($P > 0,05$).

Дослідження показника ІСПЛ засвідчило, що в групі пацієнтів із традиційним лікуванням його значення перевищувало відповідний показник в групі практично здорових в 2,16 рази ($P < 0,05$) (рис. 3). В той же час, за умови лікування із використанням ЛВР, ІСПЛ перевищував показник в групі контролю в 1,59 рази ($P < 0,05$) і при цьому був меншим, ніж в групі дітей із використанням традиційного лікування, на 26,6 % ($P < 0,05$). На тлі використання ЛВР (три тижні) у комбінації з однотижневим використанням нікотинаміду досліджуваний показник був вищим від такого в групі контролю на 44,1 % ($P < 0,05$) і одночасно меншим, ніж у пацієнтів із традиційним лікуванням на 33,5 % ($P < 0,05$). Двотижневе застосування нікотинаміду і відповідно — чотиритижневе використання ЛВР спричинило зменшення ІСПЛ, величина якого перевищувала показник в групі контролю на 14,2 % ($P > 0,05$)

і одночасно була меншою порівняно до такої в групі дітей із використанням лише ЛВР на 28,2 % ($P < 0,05$) (рис. 3, V). Використання лише ТМС супроводжувалось зменшенням показника ІСПЛ порівняно до такого, який спостерігався в групі пацієнтів із традиційним лікуванням, на 36,8 % ($P < 0,05$) (рис. 3, VI). При цьому досліджуваний показник залишався більшим порівняно до групи контролю на 35,4 % ($P < 0,05$). Поєднане застосування ЛВР (три тижні), нікотинаміду (один тиждень) на тлі впливу ТМС спричинило зниження ІСПЛ, величина якого достовірно зменшувалась як порівняно до групи із традиційним лікуванням — на 51,0 % ($P < 0,05$), так і порівняно до показника в групі пацієнтів із застосуванням лише ЛВР окремо — на 33,2 % ($P < 0,05$) (рис. 3, VII).

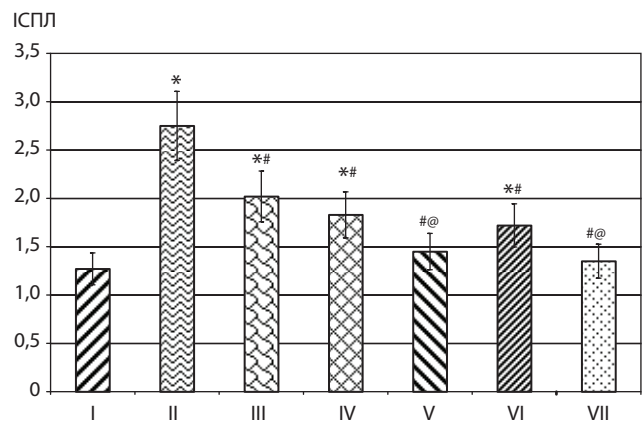


Рис. 3. Вплив леветирацетаму, нікотинаміду та ТМС зони мозочка на індекс стимульованої проліферації лімфоцитів (ІСПЛ) у хворих на епілепсію

Умовні позначення: I — контроль (практично здорові); II — традиційне лікування; III — застосування лише ЛВР (3 тижні); IV — 3-тижневе застосування ЛВР та 1-тижневе нікотинаміду; V — 4-тижневе застосування ЛВР та 2-тижневе нікотинаміду; VI — застосування ТМС; VII — ЛВР (3 тижні), нікотинамід (1 тиждень) та ТМС;

* — $P < 0,05$ — у порівнянні до показника в групі контролю; # — $P < 0,05$ — порівняно з показником у пацієнтів із традиційним лікуванням; @ — $P < 0,05$ у порівнянні до показника в групі із використанням ЛВР окремо (ANOVA ± Newman-Keuls тест)

Отримані результати засвідчили, що за умов розвитку епілепсії спостерігаються порушення з боку функціонального стану мононуклеарних клітин крові, які свідчать про підвищення продукування інтерлейкіну-1. Застосування лікування — впливу ТМС на зону мозочка — супроводжується збільшенням вмісту лептину в крові пацієнтів, які страждають на резистентну до фармакотерапії форму епілепсії, на 41,5 %, що може свідчити про його роль в реалізації лікувального впливу. При цьому поєднане застосування ТМС з ЛВР та нікотинамідом не спричиняло подальшого збільшення досліджуваного показника, що свідчить про можливість залучення інших механізмів реалізації потенційованого протиепілептичного впливу вказаних лікувальних чинників.

Важливо зазначити, що структура молекули лептину є подібною до структури прозапальних цитокінів, таких як ІЛ-2 та гормон росту 1, що визначає його прозапальні властивості [4]. Встановлено, що під впливом лептину збільшується експресія прозапальних

цитокінів, особливо фактора некрозу пухлин-альфа та ІЛ-6, що спостерігається в багатьох типах клітин, включаючи адипоцити, макрофаги та Т-лімфоцити [12, 13]. Зважаючи на вказані ефекти, протисудомні впливи лептину можуть бути зумовлені активацією центральних канабіноїдних СВ1-рецепторів, а також рецепторів опіатів [3].

Показана роль структур мозочка в регуляції імунореактивності [7—10]. Зокрема, доведено, що деструкція ядер шатра супроводжується збільшенням індукованої конканаваліном-А проліферації лімфоцитів, а також цитотоксичності натуральних кілерів [10]. В той же час деструкція інтерпозитного ядра супроводжується протилежними ефектами [7]. Деструкція ядра шатра збільшує функціональну активність хелперних лімфоцитів [9], а на тлі мозочкової атаксії, яку спричинили застосуванням 3-ацетилпіридину, збільшується експресія Т-хелперів Th1- та Th17-зв'язаних цитокінів, ІFN- γ , ІЛ-2, ІЛ-17 і ІЛ-22, яка була зниженою в CD4 Т-лімфоцитах щурів з атаксією, в той час як експресія Th2- і регуляторних — T_{рег}-зв'язаних цитокінів, ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-10 і трансформуючого фактора росту (TGF)- β збільшувалась за відсутності на тлі підвищення кількості В-лімфоцитів і антитіл IgM і IgG [8]. Можливо припустити, що збудження структур мозочка застосуванням ТМС також супроводжується імунomodulatory дією.

Встановлено протизапальну ефективність ЛВР, яка може реалізовуватись за механізмами синергії з нестероїдними анальгетиками [15]. Для дії нікотинаміду характерні протизапальні, антиоксидантні ефекти, а також пригнічення апоптозу [14]

Таким чином, потенційовані впливи одночасного застосування ТМС зони мозочка, ЛВР та нікотинаміду щодо порушень імунологічної реактивності у хворих на епілепсію можуть пояснюватись комплексною взаємодією зазначених механізмів впливу окремих лікувальних чинників.

Таким чином, у дітей, які страждають на скроневу резистентну до фармакологічного лікування епілепсію, спостерігається підвищення стимульованої ліпополісахаридом активності мононуклеарних клітин крові, яке свідчить про підвищення синтезу та вивільнення інтерлейкіну-1.

Застосування ТМС зони мозочка спричиняє збільшення вмісту лептину в крові пацієнтів.

Застосування ТМС у поєднанні з ЛВР та нікотинамідом спричиняє потенційований ефект нормалізації інтерлейкіну-1-продукуючої активності мононуклеарних клітин крові.

Список літератури

1. Адаменко Г. П. Метод определения интерлейкина-1 в культуре лимфоцитов и активированных импульсным способом моноцитов крови человека / Г. П. Адаменко // Лаб. дело. — 1990. — № 5. — С. 42—45.
2. Муратова Т. Н. Противозепилептическая эффективность леветирацетама и никотинамида у детей, страдающих резистентной к терапии формой эпилепсии / Т. Н. Муратова // Журнал Гродненского государственного медицинского университета (Беларусь). — 2014. — № 3. — С. 123—126.
3. Нейротропные свойства лептина и его влияние на фармакологическую активность агонистов бензодиазепиновых и серотониновых (5-HT_{1A}) рецепторов / [Т. Л. Карасева, В. С. Битенский, С. Г. Соболев и др.] // Вісник психіатрії та психофармакотерапії. — 2014. — № 2(26). — С. 50—56.
4. Adipokines in inflammation and metabolic disease / [N. Ouchi, J. L. Parker, J. J. Lugus, K. Walsh] // Nat. Rev. Immunol. — 2011. — Vol. 11. — P. 85—97.
5. Diano S. Anticonvulsant effects of leptin in epilepsy / S. Diano, T. L. Horvath // J. Clin. Invest. — 2008. — Vol. 118. — P. 26—28.
6. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation / G. Fantuzzi // J. Allergy Clin. Immunol. — 2005. — Vol. 115. — P. 911—919.
7. Cerebellar interposed nucleus lesions suppress lymphocyte function in rats / [Y. P. Peng, Y. H. Qiu, J. Qui, J. J. Wang] // Brain Res. Bull. — 2006. — Vol. 11. — № 71. — P. 10—17.
8. Cerebellar ataxia induced by 3-AP affects immunological function / [Y. Y. Jiang, B. B. Cao, X. Q. Wang et al.] // Neuro Endocrinology Letters. — 2015. — Vol. 29. — № 36(3). — P. 246—256.
9. Effect of cerebellar fastigial nuclear lesions on differentiation and function of thymocytes / [S. J. Ni, Y. H. Qiu, J. H. Lu et al.] // J. Neuroimmunol. — 2010. — Vol. 222. — № 1—2. — P. 40—47.
10. Effect of lesions of cerebellar fastigial nuclei on lymphocyte functions of rats / [Y. P. Peng, Y. H. Qiu, B. B. Chao, J. J. Wang] // Neurosci. Res. — 2005. — Vol. 51. — № 3. — P. 275—284.
11. Interleukin 1a increases serum leptin concentrations in humans / [J. E. Janik, B. D. Curti, R. V. Considine et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1997. — Vol. 82. — P. 3084—3086.
12. IL-1 beta mediates leptin induction during inflammation / [R. Faggioni, G. Fantuzzi, J. Fuller et al.] // Am. J. Physiol. — 1998. — 274 (1 Pt 2). — P. 204—208.
13. Juvenile obesity aggravates disease severity in a rat model of atopic dermatitis / [K. Y. Jeong, J. Lee, C. Li et al.] // Allergy Asthma Immunol. Res. — 2015. — Vol. 7. — № 1. — P. 69—75.
14. The effect of nicotinamide on gene expression in a traumatic brain injury model / [G. D. Anderson, T. C. Peterson, F. M. Farin et al.] // Front. Neurosci. — 2013; 7: 21. — DOI: 10.3389/fnins.2013.00021.
15. Tomić M. A. Levetiracetam interacts synergistically with nonsteroid analgesics and caffeine to produce antihyperalgesia in rats // M. A. Tomić, A. M. Micov, R. M. Stepanović-Petrović // J Pain. — 2013. — Vol. 14. — № 11. — P. 1371—1382.

Надійшла до редакції 02.02.2016 р.

MURATOVA Tetiana Nikolaivna, кандидат медичних наук, доцент, завідувачка кафедри неврології Одеського національного медичного університету, м Одеса; e-mail: t_n_muratova@mail.ru
MURATOVA Tetiana, MD, PhD, Associate Professor, Head of Department of Neurology of Odesa National Medical University, Odesa; e-mail: t_n_muratova@mail.ru