

УДК 619:579.842.11:615.371

## **ВИВЧЕННЯ ПАТОГЕННИХ ТА ІМУНОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ШТАМУ E. COLI IBM-1 ПІД ЧАС РОЗРОБКИ НОВИХ ІМУНОГЕННИХ ПРЕПАРАТІВ**

*Т. Б. Васильєва, Г. А. Завірюха*  
Tanya.vasyleva@gmail.com, annazavir@gmail.com

ДНУ «Державний центр інноваційних біотехнологій»,  
вул. Донецька, 30, м. Київ-03151

*У профілактиці колібактеріозу телят досягнуті певні успіхи, однак ця проблема ще далека від свого повного вирішення. Результати вивчення патогенних та імуногенних властивостей штаму E. coli IBM-1 дали основу для створення нових препаратів. Метою роботи було порівняти імуногенні властивості токсинів різних штамів E. coli, вивчити здатність екзотоксину штаму E. coli IBM-1 спричиняти імунну відповідь, а також дослідити стан природної резистентності за показниками опсоно-фагоцитарної реакції сироватки крові після імунізації вакциною «Метакол». Зараження здійснювали добовими культурами відповідних штамів для визначення летальних доз. Встановлено, що в порівнянні з іншими польовими штамми E. coli штам E. coli IBM-1 спричиняє 100 % загибель лабораторних тварин, після парентерального введення дози  $LD_{100} = 850 \times 10^6$  КУО/см<sup>3</sup>. Результати з вивчення імуногенних властивостей вакцини «Метакол» показують, що тварини дослідних груп імунізовані вакциною, до складу якої входить штам E. coli IBM-1, мають захист від колібактеріозу на 70–80 %. Встановили, що імунізація нетелів перед отелом вакциною «Метакол» активує процес фагоцитозу на 7 % і його інтенсивність на 6 % порівняно з невакцинованим поголів'ям нетелів. Встановлено, що препарат має властивість створювати специфічний імунітет проти інших штамів E. coli, а також є засобом для профілактики і лікування колібактеріозу молодняку. У перспективі продовження досліджень з вивчення імуногенних властивостей вакцинного штаму E. coli IBM-1 з метою створення нових препаратів*

**Ключові слова:** ПАТОГЕННІСТЬ, ІМУНОГЕННІСТЬ, ШТАМ, ЕКЗОТОКСИН, ФАГОЦИТОЗ, КОЛІБАКТЕРІОЗ, ПРЕПАРАТ

## **STUDY AND PATHOGENIC STRAINS IMMUNOGENIC PROPERTIES E. COLI IBM-1 IN THE DEVELOP NEW IMMUNOGENIC DRUGS**

*T. B. Vasileva, A. A. Zaviriuha*  
Tanya.vasyleva@gmail.com, annazavir@gmail.com

SSI «State center of innovation biotechnologies»,  
Donetska str., 30, Kyiv-03151

*In the prevention of colibacillosis of calves achieved some success, but the problem is still far from its full resolution. The results of the study of pathogenic and immunogenic properties of a strain of E. coli IBM-1 daly basis for the development of new drugs. The aim was to compare the immunogenic properties of the toxins of different strains of E. coli, to examine the ability of E. coli strain exotoxin IBM-1 cause an immune response and to investigate the state of natural resistance on indicators opsono-phagocytic reaction serum after immunization vaccine «Metakol». Infection was performed daily cultures of the respective strains to determine the lethal dose. Found that in comparison with other field strains of E. coli strain E. coli IBM-1 causes 100 % killing of laboratory animals after parenteral dosing  $LD_{100} = 850 \times 10^6$  CFU/c<sup>3</sup>. Results from the study of immunogenic properties of the vaccine «Metakol» show that animals immunized with vaccine research groups comprising the E. coli strain IBM-1 with protection against colibacillosis by 70–80 %. Established that immunization of heifers before calving vaccine «Metakol» activates the process of phagocytosis by 7 % and its intensity by 6 % compared with unvaccinated livestock heifers. It was established that the drug has the ability to create specific immunity against other strains of E. coli, as well as a means for the prevention and treatment of colibacillosis of young animals. In the long term continuation of studies on the immunogenic properties of the vaccine strain of E. coli IBM-1 to create new products.*

**Keywords:** PATHOGENICITY, IMMUNOGENICITY, STRAINS, EXOTOXIN, PHAGOCYTOSIS, COLIBACILLOSIS, DRUGS

## ИЗУЧЕНИЕ ПАТОГЕННЫХ И ИМУНОГЕННЫХ СВОЙСТВ ШТАММА E. COLI IBM-1 ПРИ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ ИМУНОГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Т. Б. Васильева, А. А. Завирюха

Tanya.vasyleva@gmail.com, annazavir@gmail.com

ГНУ «Государственный центр инновационных биотехнологий»,  
ул. Донецкая, 30, г. Киев-03151

*В профилактике колибактериоза телят достигнуты определенные успехи, однако эта проблема еще далека от своего полного решения. Результаты изучения патогенных и иммуногенных свойств штамма E. coli IBM-1 дали основу для создания новых препаратов. Целью работы было сравнить иммуногенные свойства токсинов различных штаммов E. coli, изучить способность экзотоксина штамма E. coli IBM-1 вызывать иммунный ответ, а также исследовать состояние естественной резистентности по показателям опсоно-фагоцитарной реакции сыворотки крови после иммунизации вакциной «Метакол». Заражение осуществляли суточными культурами соответствующих штаммов для определения летальных доз. Установлено, что по сравнению с другими полевыми штаммами E. coli, штамм E. coli IBM-1 вызывает 100 % гибель лабораторных животных, после парентерального введения дозы  $LD_{100} = 850 \times 10^6$  КОО/см<sup>3</sup>. Результаты по изучению иммуногенных свойств, вакцины «Метакол» показывают, что животные опытных групп иммунизированных вакциной в состав которой входит штамм E. coli IBM-1 имеют защиту от колибактериоза на 70–80 %. Установили, что иммунизация нетелей перед отелом вакциной «Метакол» активирует процесс фагоцитоза на 7 % и его интенсивность на 6 % по сравнению с невакцинированным поголовьем нетелей. Установлено, что препарат имеет свойство создавать специфический иммунитет против других штаммов E. coli, а также является средством для профилактики и лечения колибактериоза молодняка. В перспективе продолжение исследований по изучению иммуногенных свойств вакцинного штамма E. coli IBM-1 с целью создания новых препаратов*

**Ключевые слова:** ПАТОГЕННОСТЬ, ИМУНОГЕННОСТЬ, ШТАММ, ЭКЗОТОКСИН, ФАГОЦИТОЗ, КОЛИБАКТЕРИОЗ, ПРЕПАРАТ

Під час конструювання вакцинних препаратів важливо вивчити патогенні та імуногенні властивості штаму, що входить до складу препарату. Штучне зниження вірулентності патогенних мікроорганізмів широко використовують для виготовлення живих вакцин, які використовуються для специфічної профілактики ряду інфекційних захворювань, таких як колибактеріоз, сибірка та інші.

Ступінь вираження ознак патогенності у різних штамів E. coli значно відрізняється. Хоча збудник колибактеріозу E. coli належить до нормальної мікрофлори кишечника тварин, бактерії належать до умовно-патогенних мікробів, які здатні набувати вірулентних властивостей, спричинених екзогенними факторами і спричиняти інфекційний процес. Патогенним ешерихіям притаманні

адгезивні, інвазійні, ентеротоксичні, коліціногенні властивості [1].

Ендотоксини спричиняють порушення фізіологічних функцій у тварин, лейкопенію, вазомоторні порушення та інше. В організмі тварини накопичені ендотоксини пригнічують фагоцитарну функцію гранулоцитів і макрофагів, підсилюють запальні процеси, ускладнюють явище токсикозу, яке супроводжується слабкістю, підвищенням температури тіла, порушенням функцій кишечника, що є причиною значних крововиливів і дистрофічних змін стінки кишечника.

Екзотоксини, які продукує E. coli, належать до ентеротоксинів. Вони виробляються бактеріальними клітинами в навколишнє середовище або звільняються під час лізису самої клітини збудника. Синтез ентеротоксинів контролюється

плазмідами і передається трансмісивними детермінантами [2].

Ешерихії продукують термостабільний (ТС, *ST*), термолабільний (ТЛ, *LT*) і шигеподібний (*SLT*) етеротоксини. Екстрацелюлярний токсин патогенних ешерихій, в якому переважає ТС-фракція, має високі антигенні властивості. Крім того, екстрацелюлярний токсин є специфічним антигеном патогенних штамів кишкової палички, виділених від різних видів тварин і людини, а антисироватка отримана на токсин патогенного штаму дає перехресні реакції з метаболітами патогенних штамів від різних тварин [3, 4].

Патогенний генотип умовно патогенних бактерій може реалізуватися тільки у тварин з імунодефіцитами, ослабленою імунною реактивністю організму, які сприяють інвазії бактерій *E. coli* і прояву токсичної дії її метаболітів [5–7].

Колонізація кишечника патогенними штамми *E. coli* супроводжується швидким збільшенням популяції кишкової палички (на поверхні слизової кишечника довжиною 10 см кількість клітин *E. coli* досягає  $10^8$ ) і, як наслідок, її етеротоксинів, що ускладнює перебіг хвороби [8].

Варто зазначити, що продуктами життєдіяльності ешерихій є нейротоксин, гемолізін, ферменти муциназа, ліпаза та інші, які виділяються в менших пропорціях, але також мають негативний вплив на організм хворого молодняка. Відомо, що в патогенезі колідиарей телят безпосередньо бере участь термостабільний (*ST*) етеротоксин, а поросят — термостабільний і термолабільний токсини (*LT*) [9].

Одне з провідних місць у забезпеченні життєдіяльності тварин належить імунній системі. Аналіз літератури показує, що у вивченні інфекційної патології тварин імунологічні дослідження мають пріоритетне значення. Істотно змінюються погляди на етіологію, патогенез, діагностику, лікування та профілактику хвороб тварин, у тому числі новонароджених [10].

Відсутність даних про імунний статус організму часто призводить до розробки неефективних методів лікування тварин і профілактичних заходів.

Визначаючи імунний статус тварин необхідно враховувати клітинні і гуморальні фактори захисту.

Для оцінки стану природної резистентності використовують багато показників, зокрема фагоцитарну активність лейкоцитів крові.

За показниками опсоно-фагоцитарної реакції сироватки крові оцінюють стан природної резистентності організму. Саме фагоцити беруть участь у формуванні специфічного імунітету у тварин, завдяки своїй здатності приєднувати і фіксувати на своїй поверхні комплекс чужорідного антигену, який розпізнається Т-хелперами і є сигналом для запуску Т- і В-клітинної ланки імунітету [11].

Метою нашої роботи було дослідити здатність бактерії *E. coli* продукувати екстрацелюлярний токсин, на основі якого розробити новий препарат «Метакол». Вивчити вплив препарату на клітинні фактори імунітету.

### Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були патогенні і вакцинні штами *E. coli*, експериментальна серія препарату «Метакол». У досліді використовували інбредних білих мишей (лінії СВА, ВА, В/с); нетелів та отриманих від них телят. Екзотоксини *E. coli* отримували під час вирощування на рідкому живильному середовищі упродовж 48 годин. Для вивчення патогенних властивостей використали штами, виділені з патологічного матеріалу та музею штамів і мікроорганізмів ДНУ «Державний центр інноваційних біотехнологій». Від кожного штаму був отриманий екстрацелюлярний токсин (антиген) за такою схемою: на чашки Петрі з середовищем Ендо розсівали окремо кожен культуру, вирощували 48 годин і дорощували на рідкому живильному середовищі упродовж наступних двох діб. Отриману культуральну рідину фільтрували через бактеріологічний фільтр марки F 5 (Україна).

Для досліду було створено чотири дослідні і одну контрольну групи. У кожній групі по 10 білих мишей масою  $17,1 \pm 0,26$  г. Кожну групу імунізували певним антигеном (екзотоксином), отриманим попередньо. Тваринам контрольної групи

вводили фізіологічний розчин однакової дози. Імунізацію проводили двічі з інтервалом 14 днів у дозі 0,2 см<sup>3</sup>. Після останньої імунізації через 14 днів тварин усіх груп заражали добовою культурою *E. coli* IBM-1, вирощеною на поживному агарі, в дозі 850 x 10<sup>6</sup> КУО/см<sup>3</sup>.

Вивчаючи імуногенні властивості штаму *E. coli* IBM-1, створили чотири дослідні і одну контрольну групи. Усіх тварин дослідних груп імунізували препаратом «Метакол» дворазово з інтервалом 14 днів у дозі 0,2 см<sup>3</sup>. Через 14 днів після останньої імунізації проводили зараження внутрішньочеревно.

Для зараження використовували добові агарові культури відповідних штамів. Попередньо для кожного штаму визначали летальну дозу. Спостереження за тваринами проводили 10 днів.

Для вивчення факторів клітинного імунітету використовували препарат «Метакол». З метою створення колострального імунітету, тільних нетелів імунізували дворазово: перший раз за 45–60 днів до отелу, підшкірно, у дозі 3–5 см<sup>3</sup> (з розрахунку 1 см<sup>3</sup> препарату на 100 кг маси тварини), другий раз — за 14–20 днів до отелу, внутрішньошкірно безголковим ін'єктором дозою 0,4 см<sup>3</sup> за одне введення. Молодняк щеплювали з 10–20-денного віку внутрішньошкірно такою ж самою дозою. Кров для дослідження брали з яремної вени, вранці до годування. У нетелів брали кров через 2 тижні після другої імунізації, у

новонароджених телят — до випоювання молозивом, у 3- і 10-денних телят до щеплення (телят імунізують на 10-у добу — відповідно до настанови з застосування) і на 24-й день (через 14 днів після імунізації). З нетелів та отриманих від них телят було сформовано 2 групи: дослідна і контрольна. До дослідної групи належали телята, отримані від імунізованих нетелей, в контрольну — від не імунізованих. Клітинний фактор резистентності визначали за показниками фагоцитарної активності (ФА), інтенсивності (індексу) фагоцитозу (ІФ) за методикою В. Ю. Чумаченко [12]. Статистичну обробку проводили у MS Excel.

### Результати й обговорення

Результати проведених досліджень з вивчення патогенних властивостей штаму *E. coli* IBM-1 показали, що за період спостереження за тваринами (10 днів) у дослідних групах № 2 та № 3 загинуло по 7 тварин, в групі № 4 — 8 тварин. У групі № 5 — 10 голів залишилися живими. У контрольній групі № 1 всі тварини загинули.

У результаті досліджень встановлено, що штам *E. coli* IBM-1 має патогенні властивості, та спричиняє 100 % загибель лабораторних тварин після парентерального введення в дозі LD<sub>100</sub> = 850 x 10<sup>6</sup> КУО/см<sup>3</sup>. Результати дослідження представлені у таблиці 1.

Таблиця 1

Патогенні властивості штаму *E. coli* IBM-1 у дослідах на білих мишах (LD<sub>100</sub>=850 x 10<sup>6</sup> КУО/см<sup>3</sup>)

Групи тварин	Загинуло тварин	
	голів	%
контрольна	10	100
дослідна 1	7	70
дослідна 2	7	70
дослідна 3	8	80
дослідна 4	0	0

Примітка: Кількість тварин у групі становила 10 голів

Результати з вивчення імуногенних властивостей, вакцини «Метакол» довели (табл. 2), що тварини дослідних груп імунізовані вакциною, до складу якої

входить штам *E. coli* IBM-1, мають захист від колибактеріозу 70–80 %.

Щоб експериментально обґрунтувати імуногенну ефективність препарату

«Метакол» необхідно визначити вакцинованих нетелів та отриманого від фагоцитарну активність та інтенсивність фагоцитозу сироватки крові у сільськогосподарських тварин, а саме у них потомства у різному віці.

Таблиця 2

Вплив препарату «Метакол» на різні штами *E. coli*

Групи тварин	Доза зараження через 14 діб	Кількість тварин, що вижили	
		голів	%
контрольна	<i>E. coli</i> IBM-1; $850 \times 10^6$ КУО/см <sup>3</sup>	0	0
дослідна 1	<i>E. coli</i> Бершадь; $425 \times 10^6$ КУО/см <sup>3</sup>	7	70
дослідна 2	<i>E. coli</i> Чайка; $900 \times 10^6$ КУО/см <sup>3</sup>	7	70
дослідна 3	<i>E. coli</i> Плешкані; $890 \times 10^6$ КУО/см <sup>3</sup>	8	80
дослідна 4	<i>E. coli</i> IBM-1; $850 \times 10^6$ КУО/см <sup>3</sup>	10	100

Примітка: Кількість тварин у групі становила 10 голів

За результатами досліджень фагоцитозу зросла на 7 і 6 % відповідно, встановлено, що у вакцинованих нетелів порівняно з показниками тварин фагоцитарна активність та інтенсивність фагоцитозу зросла на 7 і 6 % відповідно, порівняно з показниками тварин контрольної групи (табл. 3).

Таблиця 3

Фагоцитарна активність та інтенсивності фагоцитозу у сироватці крові великої рогатої худоби після імунізації вакциною «Метакол» ( $M \pm m$ ;  $n=10$ )

Група	Група	ФА, %	ІФ Мікр/лейк
Група 1	Контроль	35,4±0,79	7,3±0,30
	Дослід	37,0±0,46*	7,8±0,21*
Група 2	Контроль	35,8±0,52	7,1±0,17
	Дослід	36,7±0,34*	7,5±0,18*
Група 3	Контроль	36,0±0,75	7,5±0,09
	Дослід	37,0±0,17*	7,5±0,11*
Група 4	Контроль	37,0±0,21	7,6±0,16
	Дослід	37,2±0,49*	7,8±0,14*
Група 5	Контроль	36,0±0,30	7,6±0,17
	Дослід	38,2±0,24*	8,2±0,14*

Примітка: група 1 — нетелі, група 2 — новонароджені від нетелів, група 3 — телята віком 3 доби, група 4 — телята віком 10 діб, група 5 — телята віком 24 доби; \* —  $P < 0,05$ ; \*\* —  $P < 0,01$  порівняно із показниками тварин контрольної групи

Вивчені показники опсоно-фагоцитарної реакції сироватки крові у новонароджених, 3- та 10-денних телят, отриманих від вакцинованих нетелів, з метою вивчення впливу вакцини на активність клітинного імунітету в колостральний період.

Аналіз результатів досліджень показав, що через 14 днів після імунізації телят, отриманих від імунізованих нетелей, фагоцитарна активність у тварин зросла на 6 %, інтенсивність фагоцитозу — на 5 %, порівняно з показниками не імунізованих телят, отриманих від нетелей контрольної групи.

Отже, імунізація нетелів перед отелом вакциною «Метакол» проти колібактеріозу активує процес фагоцитозу

на 7 % і його інтенсивність на 6 % порівняно з невакцинованим поголів'ям нетелів.

Встановлено, що вакцинація в 10-денному віці молодняку, отриманого від імунізованих нетелей, активує фагоцитоз на 6 %, а його інтенсивність на 5 %, що вказує на доцільність проведення імунізації телят у 10-денному віці для підвищення факторів захисту в телят у молозивний період.

На підставі результатів досліджень встановлено, що вакцина «Метакол» має властивість створювати специфічний імунітет проти інших штамів *E. coli*. Препарат «Метакол» є засобом для профілактики і лікування колібактеріозу молодняку.

## Висновки

1. Патогенний штам *E. coli* IBM-1 спричиняє загибель 100 % лабораторних тварин після парентерального введення в дозі  $LD_{100} = 850 \times 10^6$  КУО/см<sup>3</sup>.

2. Імунізація препаратом «Метакол» лабораторних тварин створює імунітет проти інших патогенних штамів *E. coli*.

3. Вивчення фагоцитарної активності та інтенсивності фагоцитозу сироватки крові у великої рогатої худоби різних вікових груп вказують, що імунізація препаратом «Метакол» нетелів (матерів) стимулює у них та їхніх нащадків інтенсивність фагоцитозу.

4. Препарат «Метакол» може застосовуватися з метою профілактики та боротьби з колибактеріозом сільськогосподарських тварин.

**Перспективи подальших досліджень.** На основі отриманих експериментальних даних щодо впливу препарату «Метакол» на фагоцитарну активність та інтенсивність фагоцитозу сироватки крові сільськогосподарських тварин доцільно продовжити дослідження з вивчення імуногенних властивостей виробничого штаму *E. coli* IBM-1 з метою створення препаратів для боротьби з інфекційними хворобами спільними для людей і тварин.

1. Bondarenko V. M. «Ostrova» patogennosti bakterii [The «island» of pathogenicity bacteria]. *Jyurnal mirobiologii, epidemiologii, immynologii* — *Journal of Microbiology, epidemiology immunology*, 2001, vol. 4, pp. 67–74 (in Russian).

2. Volynets L., Kozlovska A., Stepaniyk O. Vuvchennya faktoriv patogennosti epizootichnux shtamiv zbydnuka kolibakteriozy telyat [The study of the pathogenic factors epidemic strains colibacillosis calves]. *Veterinarna medicina Ukrainu* — *Veterinary Medicine of Ukraine*, 1997, vol. 4, pp. 21–22 (in Ukrainian).

3. Kravciv Y. R., Dackiv O. M. Imynni reakcii na antugenny stumylyaciy [The immune response to antigenic stimulation]. *Mizhvidomchiiy tematychniy naykoviy zbirnyk* [Interdepartmental thematic research collection], 2002, no. 80, pp. 324–325 (in Ukrainian).

4. Emelyanenko P. A. Enterotoksyny kishechnykh bakteriy [Enterotoxins intestinal

bakteriy]. *Veterinariya* — *Veterinary Medicine*, 2000, vol. 2, pp. 25–27 (in Russian).

5. Didok Y.V., Golovko A. M. Predacha plasmid, yaki kodyyut syntez fimbriy vid esherishiy do salmonel [Transfer of plasmids encoding the synthesis of pili from *E. coli* to *Salmonella*]. *Visnyk Sym'skogo DAY: Naykovometodychniy zhyrnl* — *Bulletin of Sumy State Agrarian University: Scientific-methodical journal*, 1999, vol. 4, pp. 33–35 (in Ukrainian).

6. Fuks P. P., Golovko A. M., Krasnikov G. A., Ushkalov V. O. Vyvchennia ta zastosyvannia fenomeniv adgezii i toksynoytvorennia dlia rozrobki tekhnologii vygotovlennia novykh diagnostychnykh ta vaktsynnykh preparativ [Learning and applying the phenomena of adhesion and toxin production technology to develop new diagnostic and vaccine preparations]. *Visnyk agrarnoi nauku* — *Journal of Agricultural Science*, 1995, vol. 10, pp. 88–95 (in Ukrainian).

7. Makarov V. V., Gusev A. A., Panin A. N. Transmissivnye geneticheskie determinanty patogennosti [Transmissible genetic determinants of pathogenicity]. *Veterinariia* — *Veterinary Medicine*, 2000, vol. 3, pp. 16–21 (in Russian).

8. Zviagintseva T. D., Gridneva S. V. Sovremennye predstavleniia o sosydistom endotelii v norme i pri patologii zhelydochno-kishechnogo trakta [Modern views on the vascular endothelium in normal and pathological conditions of the gastrointestinal tract]. *Eksperymentalnaia i klinicheskaia gastroenterologia* — *Experimental and Clinical Gastroenterology*, 2005, vol. 4, pp. 6–11 (in Russian).

9. Levchenko V. I., Zaiarniuk V. P. *Shlunkovo-kyshkovi khvoroby novonarodzhenykh teliat* [Gastrointestinal disease of the newborn calves: method. recommendations for students and trainees FVM Inst pisyadyp. Teach]. White Church publ., 1997. 81 p. (In Ukrainian)

10. Apatenko V. M. *Veterynarna imunologiiia ta imunopatologiiia* [Veterinary Immunology and Immunopathology]. Kyiv, Yrozhai Publ., 1994. Pp. 58–61 (in Ukrainian).

11. Chumachenko V. Y., Chumachenko V. V., Pavlenko O. I. Doslidzhennia imunnoi systemu. Faktor, shcho vpluvaiut na rezistentnisi tvarun [The study of the immune system. Factors affecting the resistance of animals]. *Veterinarna medicina Ukrainu* — *Veterinary Medicine of Ukraine*, 2004, vol. 5, pp. 33–37 (in Ukrainian).

12. Chumachenko V. Y., Chumachenko V. V., Vysotskii A. M., Serdiuk N. A. *Opredelenie eatestvennoi rezistentnosti i obmena veshchestv u selskokhoziaistvennykh zhuvotnykh* [Determination of natural resistant and metabolism in farm animals]. Kyiv, Yrozhai Publ., 1990. 136 p. (In Russian).