

## СТЕХИОМЕТРИЯ ЦИТОХРОМОВ И НАПРЯЖЕНИЕ КИСЛОРОДА В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ МОРСКИХ РЫБ

А. А. СОЛДАТОВ<sup>1</sup>, И. А. ПАРФЕНОВА<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского НАН Украины, Севастополь;  
e-mail: alekssoldatov@yandex.ru;

<sup>2</sup>Таврический национальный университет им. В. И. Вернадского, Симферополь, Украина

*Изучено распределение напряжения кислорода и особенности стехиометрии цитохромов в скелетных мышцах донных и пелагических видов морских рыб. Показано, что ограничение двигательной активности приводит к увеличению числа гипоксических зон в мышечной ткани. Электронтранспортная цепь при этом приобретает нескомпенсированный тип организации, выражающийся в увеличении доли терминального комплекса  $aa_3$  на фоне общего снижения содержания цитохромов в мышцах. Реакция, по-видимому, носит адаптивный характер и может быть реализована у оксифильных видов рыб в условиях экспериментальной гипокинезии.*

*Ключевые слова: стехиометрия цитохромов, напряжение кислорода, скелетные мышцы, морские рыбы.*

**Н**изкая скорость диффузии кислорода в водной среде является основной причиной широкого распространения зон кислородных экстремумов в водах Мирового океана [1]. Состояние гипоксии для бентосных организмов (моллюсков, донных рыб), постоянно обитающих в этих акваториях, является функциональной нормой и предполагает существенную реорганизацию метаболических процессов, направленную на оптимизацию энергетических трат организма [2]. Наряду со снижением интенсивности метаболических процессов у них отмечается повышение содержания в тканях аланина и сукцината как конечных продуктов обмена, что не свойственно аэробному обмену [3], усиливается продукция  $NH_4^+$  [4, 5], растет активность аланин- и аспартатаминотрансфераз [6], активизируются процессы переаминирования аминокислот (глутамата, аланина) [7]. Показано также, что энзимные системы цикла Кребса могут быть задействованы в анаэробных процессах генерации энергии [3].

В этой связи представляют интерес сравнительные исследования особенностей метаболических процессов и организации молекулярных систем в тканях оксифильных и толерантных к гипоксии и аноксии гидробионтов. Представители донной и пелагической ихтиофауны в этом отношении являются наиболее удобными

объектами исследований. Показано, что малоактивные виды рыб имеют более низкую плотность капиллярной сети в мышцах [8], наблюдается снижение содержания гемоглобина и числа эритроцитов в крови [9]. Напряжение кислорода в их тканях также снижается [10], что допускает наличие особенностей не только в организации метаболических процессов, но и ряда молекулярных систем, в частности электронтранспортной цепи митохондрий.

В настоящей работе проводится сравнительная оценка особенностей стехиометрии цитохромов и распределения напряжения кислорода в скелетных мышцах донных и пелагических видов черноморских рыб.

### Материалы и методы

Исследования выполнены на трех пелагических видах рыб: кефали-сингиле (*Liza aurata*), кефали-пиленгасе (*Liza hamatocheila*), ставриде черноморской (*Trachurus mediterraneus*), и трех донных видах: бычке-кругляке (*Neogobius melanostomus*), бычке-мартовике (*Mesogobius batrachocephalus*), камбале-глоссе (*Platichthys flesus*). Использовали взрослых половозрелых особей в состоянии относительного физиологического покоя (стадия зрелости гонад – II–III).

Рыбу перевозили в пластиковых баках емкостью 50 л с воздушной аэрацией. При транс-

портировке материала на значительные расстояния использовали полиэтиленовые мешки, атмосферу в которых заполняли чистым кислородом.

После транспортировки животных помещали в аквариумы и бассейны объемом 200–1500 л, с централизованными системами воздушной аэрации и терморегуляции. Плотность посадки составляла 50–80 л на одну особь. Фотопериод – 12 часов день : 12 часов ночь. Температура воды поддерживалась на уровне  $15 \pm 1$  °С. В данных условиях рыбу содержали в течение 30–45 суток с целью адаптации и снятия стресса, вызванного отловом и транспортировкой. В этот период особей кормили фаршем из малоценных видов рыб.

Для уточнения эффектов гипокинезии были выполнены исследования на кефале-пиленгаса. Контрольная группа рыб находилась в бетонных бассейнах (размеры 80×4 м). Ее фоновая двигательная активность не была ограничена. Опытную группу рыб содержали в течение пяти месяцев в условиях ограниченной подвижности: садки размером не более 1 м<sup>3</sup> (по 5–6 особей на садок). Данные условия содержания исключали активное перемещение особей.

Пробы артериальной и венозной крови получали соответственно пункцией дорсальной аорты (*aorta dorsalis*) и хвостовой вены (*vena caudalis*) в шприц под слой вазелинового масла [11]. Образцы мышечной ткани отбирали из большой белой боковой мышцы (*musculus lateralis magnus*). В момент отбора проб и регистрации показателей применяли уретановую анестезию [12].

Перед измерением напряжения кислорода в мышцах ( $P_mO_2$ ) особей под анестезией фиксировали в специальном станке, исключающим продольные движения. Станок помещали в лоток с морской водой.  $P_mO_2$  измеряли при помощи остеклованных платиновых микроэлектродов с диаметром кончика 4–6 мкм. После изготовления, их состаривали и калибровали по методу, описанному ранее [13]. Электроды вводили путем прокола кожи на глубину 7–8 мм, предварительно удалив чешую. По ходу движения электрода проводили отдельные измерения. Диффузионный ток кислорода при потенциале поляризации 0,55–0,65 V регистрировали с помощью усилителя постоянного тока ОР-925 (Radelkis, Венгрия). В качестве вспомогательного электрода применяли стандартный каломельный, который

погружали в воду лотка, где находилась рыба. Данные, полученные от разных особей, объединяли и строили суммарные гистограммы распределения  $P_mO_2$ . На одну гистограмму приходилось 100 отдельных измерений.

Напряжение кислорода в пробах артериальной ( $P_aO_2$ ) и венозной ( $P_vO_2$ ) крови измеряли на кислотно-щелочном анализаторе ОР-210 (Radelkis, Венгрия).

Определение содержания цитохромов ( $aa_3$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $c_1$ ) проводили по методу Чанса в модификации Евдотиенко, Моховой [14]. Измерения выполняли на гомогенатах тканей, так как при выделении митохондрий происходит частичная потеря цитохромов группы  $c$  [15], что важно при расчете стехиометрических отношений. Гомогенаты готовили на среде, содержащей 120 мМ КСl и 20 мМ трис-НСl буфера (рН 7,4).

Статистическую обработку и графическое оформление полученных результатов проводили с применением стандартного пакета Grapher (версия 3). Результаты представлены в виде  $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ . Достоверность различий оценивали при помощи непараметрического U-критерия Манна–Уитни [16].

## Результаты и обсуждение

*Напряжение кислорода в крови и мышцах.* Сравнительная оценка величин  $P_aO_2$  (табл. 1) показала, что у пелагических рыб она почти в 2 раза выше ( $P < 0,001$ ), чем у донных видов (бычки). Исключение – камбала-глосса. Относительно пиленгаса различия составляли 20% ( $P < 0,05$ ). Полученные результаты отражают известные закономерности, установленные для других видов морских рыб, отличающихся уровнем естественной подвижности [17, 18]. В основе этих различий лежит низкая интенсивность энергетического обмена у малоподвижных рыб [19]. Это исключает активную вентиляцию жаберных полостей и осложняет диффузию кислорода на уровне водно-гематического барьера.

Аналогичные результаты получены и для  $P_vO_2$ . У бычков зарегистрированные значения в 2 раза ниже ( $P < 0,001$ ), чем у активных рыб. У глоссы они отмечены только при сравнении с сингилем – 48% ( $P < 0,001$ ). Данные различия определяются комплексом причин. Известно, что малоактивные виды по сравнению с пелагическими имеют более низкую плотность капиллярной сети в мышцах, выраженные различия в

Таблиця 1. Напряжение кислорода в крови рыб различной естественной подвижности

Виды рыб	<i>n</i>	$P_aO_2$ , гПа	$P_vO_2$ , гПа
Сингиль	16	110,8 ± 3,3	47,5 ± 2,0
Пиленгас	12	98,4 ± 5,4	34,4 ± 1,8
Ставрида	16	126,3 ± 3,6	37,7 ± 1,1
Кругляк	14	49,9 ± 2,4	18,6 ± 0,6
Мартовик	14	55,2 ± 1,9	17,2 ± 0,7
Глосса	16	82,4 ± 1,9	32,1 ± 1,1

Примечание: *n* – число рыб

геометрии капилляров, диффузионных расстояниях и площадях [8]. Их дополняет низкая скорость тканевого объемного кровотока, уменьшенная кислородная емкость крови, что в целом ограничивает величину массопереноса кислорода в скелетных мышцах [8, 20].

$P_vO_2$  хвостовой вены – интегральный показатель, который позволяет судить о величине

напряжения кислорода в мышцах рыб, однако, не отражает характер мышечной композиции. Известно, что доля красных мышц у пелагических рыб может достигать 48%, тогда как у донных видов явно доминируют белые мышцы [9]. Чтобы исключить этот момент, исследовали фактическое  $P_mO_2$  в белых мышцах обеих групп рыб (рис. 1).

Средние величины  $P_mO_2$  для серии измерений в белых мышцах пелагических рыб составляют 10,3 ± 0,3; 11,1 ± 0,2 и 12,3 ± 0,2 гПа соответственно для сингиля, пиленгаса и ставриды (рис. 1). У представителей донной ихтиофауны они в 1,5–2,5 раза ( $P < 0,001$ ) ниже (5,7 ± 0,3 гПа – кругляк, 5,1 ± 0,1 гПа – мартовик, 7,9 ± 0,1 гПа – глосса). Диапазон изменения  $P_mO_2$  в белых мышцах близкий у обеих групп рыб – 0–20 гПа. При этом максимумы на гистограммах распределения у пелагических рыб располагаются в области более высоких значений (на 2–4 гПа правее). Анализ частотного распределения показал, что основная масса значений – 55–70% у них прихо-

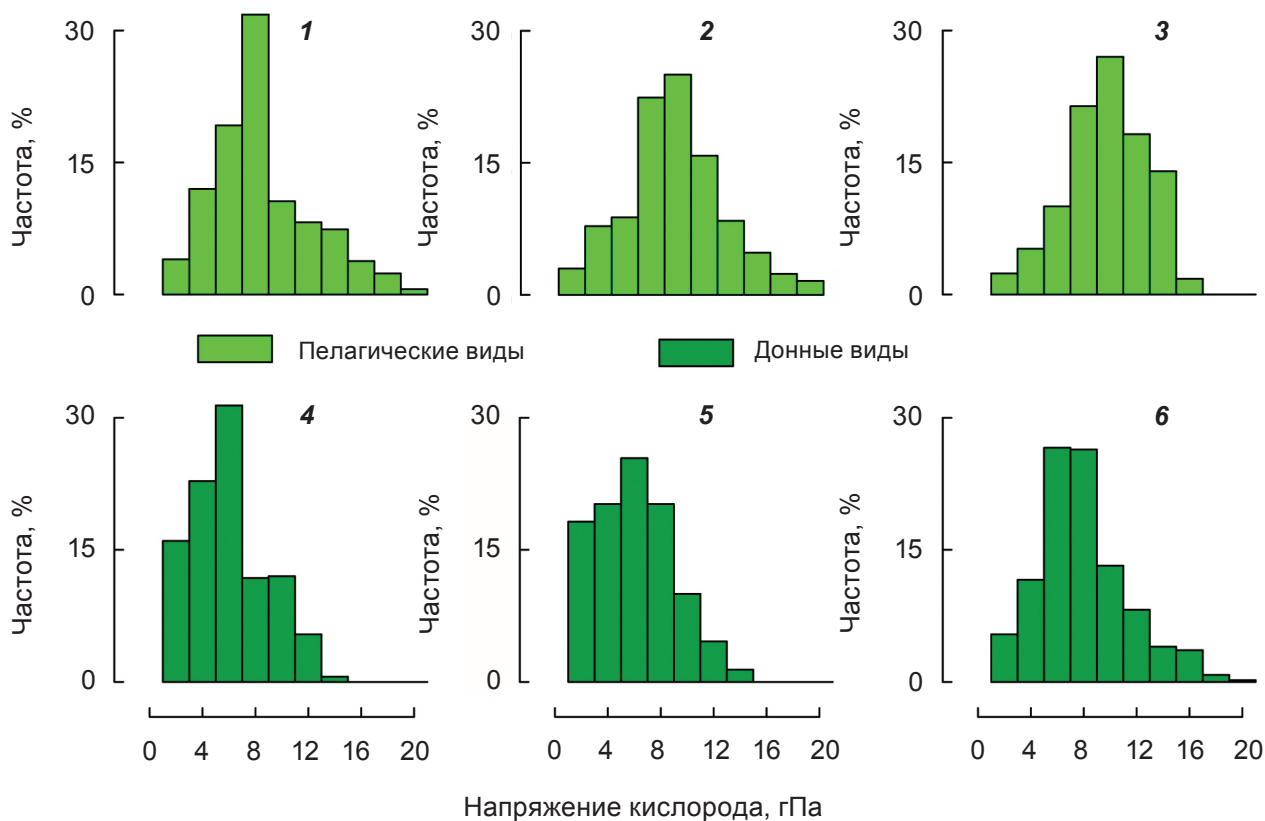


Рис. 1. Распределение  $P_mO_2$  в белых скелетных мышцах рыб различной естественной подвижности: 1 – сингиль; 2 – пиленгас; 3 – ставрида; 4 – кругляк; 5 – мартовик; 6 – глосса, *n* = 100 измерений на гистограмму

дится на диапазон 5–10 гПа, тогда как у донных рыб – на 1–9 гПа. Особо следует обратить внимание на зоны с напряжением кислорода менее 4 гПа, где реализуются преимущественно анаэробные процессы. У высокоподвижных рыб их доля составляла 7–14%. У бычков (кругляк, мартовик) она в 2,5–5,5 раза выше. Для глоссы получены более низкие значения – 15–16%.

Наличие в мышечной ткани рыб зон с высоким локальным  $P_m O_2$ , а также зон с крайне низким  $P_m O_2$  (менее 4 гПа) свидетельствует о том, что в ней одновременно могут протекать как аэробные, так и анаэробные процессы, так как при напряжении кислорода менее 4 гПа цитохромоксидаза митохондрий практически не функционирует. Это означает, что при нормальном содержании кислорода в среде в 7–14% белых мышц пелагических видов, а также в 15–38% белых мышц донных видов протекают анаэробные процессы. Характер распределения  $P_m O_2$  свиде-

тельствует о том, что мышечная ткань донных рыб по сравнению с пелагическими находится в состоянии гипоксии. В этой связи изучение особенностей организации цитохромной цепи у рыб разной подвижности представляет определенный интерес

*Цитохромная система мышц.* Скелетные мышцы пелагических рыб отличаются повышенным содержанием цитохромов по сравнению с донными видами (рис. 2). Различия достигают 3,7–5,9 раза ( $P < 0,001$ ), что хорошо согласуется с низкой интенсивностью аэробных процессов в тканях малоподвижных видов рыб. Максимум отмечается у ставриды, а минимум – у мартовика.

Анализ содержания отдельных групп цитохромов также показал наличие существенных отличий. Наибольшие отклонения отмечаются в содержании цитохрома *b*. У пелагических видов уровень его в белых мышцах в 6,1–11,0 раз

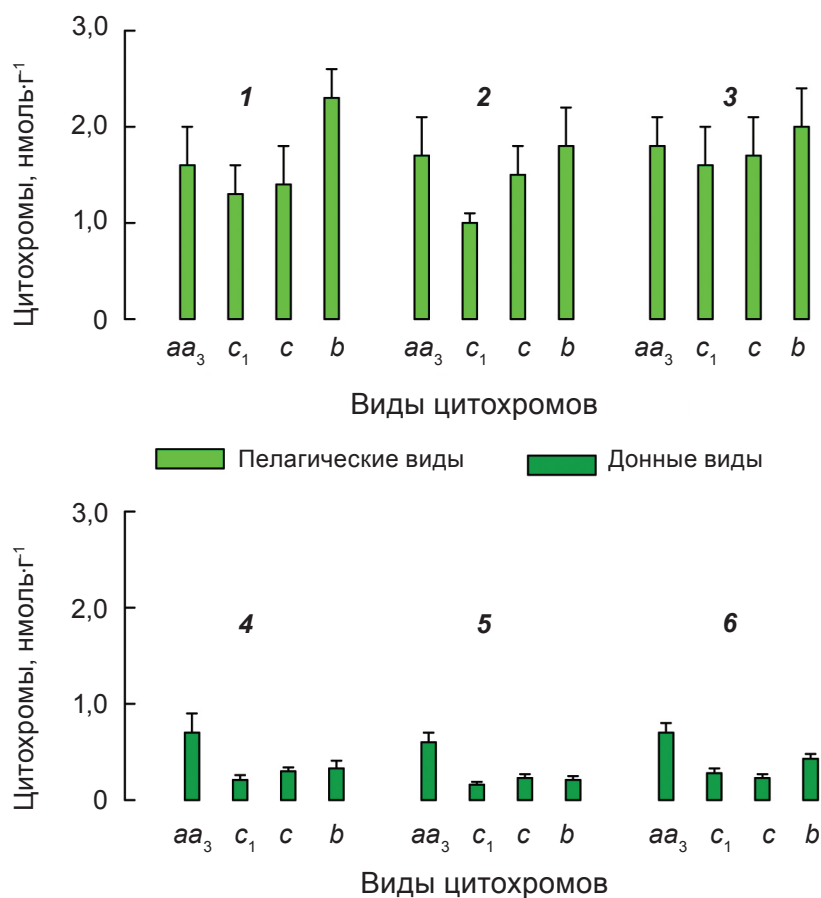


Рис. 2. Содержание цитохромов в белых скелетных мышцах рыб различной естественной подвижности: 1 – сингиль; 2 – пиленгас; 3 – ставрида; 4 – кругляк; 5 – мартовик; 6 – глосса

Таблиця 2. Содержание цитохромов и их стехиометрия в мышечной ткани рыб различной естественной подвижности

Виды рыб	<i>n</i>	Цитохромы, нмоль·г <sup>-1</sup>	<i>b/aa<sub>3</sub></i>	<i>c+c<sub>1</sub>/aa<sub>3</sub></i>	<i>c/aa<sub>3</sub></i>	<i>c<sub>1</sub>/aa<sub>3</sub></i>
Сингиль	7	6,6 ± 0,4	1,68 ± 0,35	2,18 ± 0,45	0,94 ± 0,22	1,23 ± 0,46
Пиленгас	8	6,0 ± 0,4	1,47 ± 0,34	2,20 ± 0,58	1,37 ± 0,40	0,83 ± 0,20
Ставрида	7	7,1 ± 0,3	1,16 ± 0,13	3,10 ± 1,63	1,66 ± 1,02	1,44 ± 0,66
Кругляк	7	1,54 ± 0,20	0,77 ± 0,31	1,14 ± 0,31	0,68 ± 0,20	0,45 ± 0,14
Мартовик	7	1,20 ± 0,10	0,50 ± 0,13	0,88 ± 0,21	0,49 ± 0,10	0,39 ± 0,12
Глосса	8	1,64 ± 0,10	0,83 ± 0,23	0,76 ± 0,08	0,34 ± 0,04	0,42 ± 0,05

Примечание: *n* – число особей

(*P* < 0,001) выше, чем у донных рыб. Разница в содержании комплекса *aa<sub>3</sub>* не столь значительна и достигает 2,3–2,7 раза (*P* < 0,001).

Принципиальные отличия между данными экологическими группами рыб отмечали и в организации цитохромных систем (табл. 2). У донных видов содержание комплекса *aa<sub>3</sub>* на 23,9–58,7% (*P* < 0,05) превышает уровень цитохромов *b*, *c*, *c<sub>1</sub>*. Отношения *b/aa<sub>3</sub>*, *c<sub>1</sub>/aa<sub>3</sub>* и *c/aa<sub>3</sub>* составляют меньше единицы, то-есть для мышечной ткани этих рыб характерна некомпенсированная (гипоксическая) стехиометрия цитохромов. У пелагических видов, напротив, стехиометрия цитохромов была близка к наземным животным. Уровень *aa<sub>3</sub>* в красных и белых мышцах минимальный, а отношения *b/aa<sub>3</sub>*, *c<sub>1</sub>+c/aa<sub>3</sub>* значительно превышают единицу. Наиболее показательны различия между донными и пелагическими видами по отношению *b/aa<sub>3</sub>* – в 1,4–3,4 раза (*P* < 0,001).

Оценка коррелятивных связей между *P<sub>v</sub>O<sub>2</sub>* и *b/aa<sub>3</sub>* показала, что между этими величинами существует выраженное сопряжение, о чем свидетельствуют высокие значения коэффициента детерминации (*R*<sup>2</sup>) (рис. 3). Это означает, что кислородный режим ткани следует рассматривать как фактор, определяющий характер организации цитохромной цепи митохондрий.

Случаи некомпенсированной стехиометрии цитохромов отмечены в условиях нарушения кислородного режима тканей и у других гидробионтов [21]. Подобный тип организации дыхательной цепи носит явно адаптивный характер, так как позволяет функционировать митохондриям в условиях следового содержания кислорода [21]. Однако остается неясно, это качество генетически детерминировано (видоспецифично) или оно является результатом функцио-

нальной адаптации. Это обусловило постановку дополнительного эксперимента.

**Экспериментальная гипокинезия.** Как уже отмечалось, эксперимент был выполнен на кефали-пиленгасе, имеющей обычный тип стехиометрии цитохромов (с преобладанием цитохрома *b*). Величина *P<sub>v</sub>O<sub>2</sub>* у контрольной группы рыб составляет 98,4 ± 5,4 гПа. В условиях гипокинезии она понижается на 22,3% (*P* < 0,001) и достигает 76,5 ± 4,2 гПа, что свидетельствует о развитии артериальной гипоксемии. Это не может не сказаться на кислородном режиме тканей пиленгаса.

Среднее *P<sub>m</sub>O<sub>2</sub>* в мышцах контрольной группы рыб составляет 8,2 ± 0,2 гПа. Гипокинезия вызывает снижение значений данного показателя на 20,7% (*P* < 0,001). У опытной группы оно

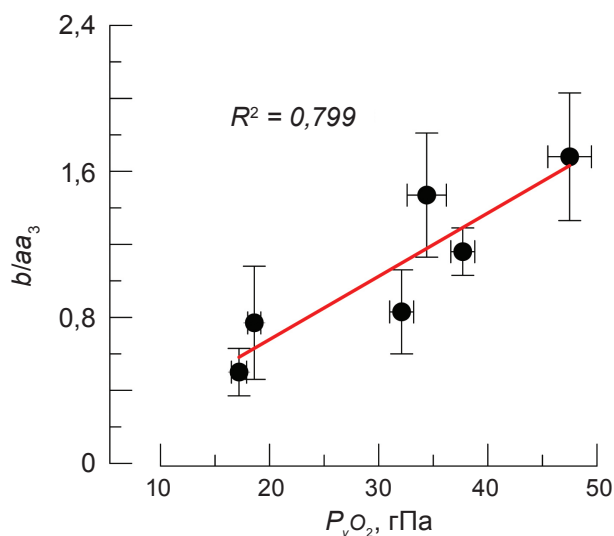


Рис. 3. Корреляционные отношения между *P<sub>v</sub>O<sub>2</sub>* и *b/aa<sub>3</sub>* в белых скелетных мышцах рыб различной естественной подвижности



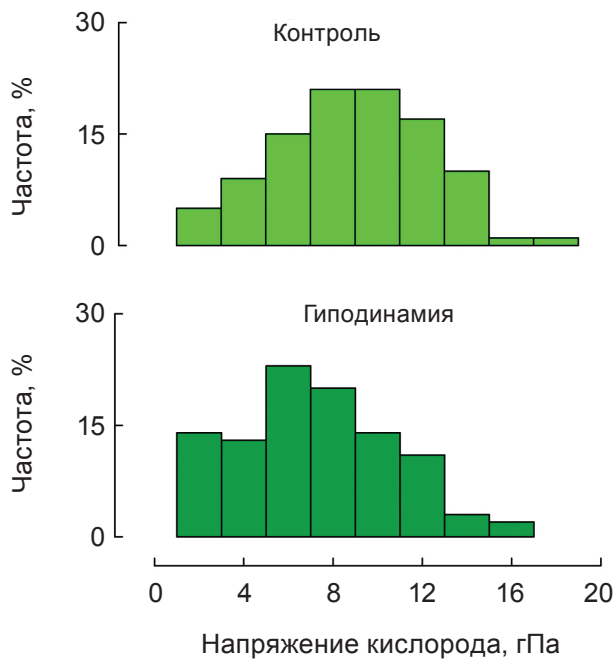


Рис. 4. Распределение  $P_{mO_2}$  в белых скелетных мышцах пиленгаса в условиях экспериментальной гипокинезии

составляет  $6,5 \pm 0,3$  гПа. В распределении  $P_{mO_2}$  отмечается смещение максимума влево (рис. 4). Доля гипоксических зон (менее 4 гПа) в мышечной ткани возрастает почти в 2 раза и достигает 27% от общего числа измерений.

Суммарное содержание цитохромов в мышечной ткани пиленгаса в ходе эксперимента существенно снижается (рис. 5). Наибольшие изменения претерпевает концентрация цитохрома  $b$ . Так, если уровень снижения цитохромов  $aa_3$ ,  $c$ ,  $c_1$  находится в пределах 30–40% ( $P < 0,001$ ) от исходного содержания, то концентрация цитохрома  $b$  уменьшается на 60–65% ( $P < 0,001$ ).

Разнонаправленность изменения содержания цитохромов в ткани влияет на характер организации дыхательной цепочки митохондрий в целом. Отношение  $b/aa_3$  в мышцах снижается с  $1,16 \pm 0,10$  до  $0,75 \pm 0,14$  ( $P < 0,05$ ). Как видим, цитохромная система белых мышц пиленгаса приобретает некомпенсированный характер, свойственный донным видам. Следует отметить, что отношения  $c/aa_3$ ,  $c_1/aa_3$  и  $c+c_1/aa_3$  остаются на уровне контрольных значений.

Результаты экспериментальных исследований позволяют констатировать тот факт, что

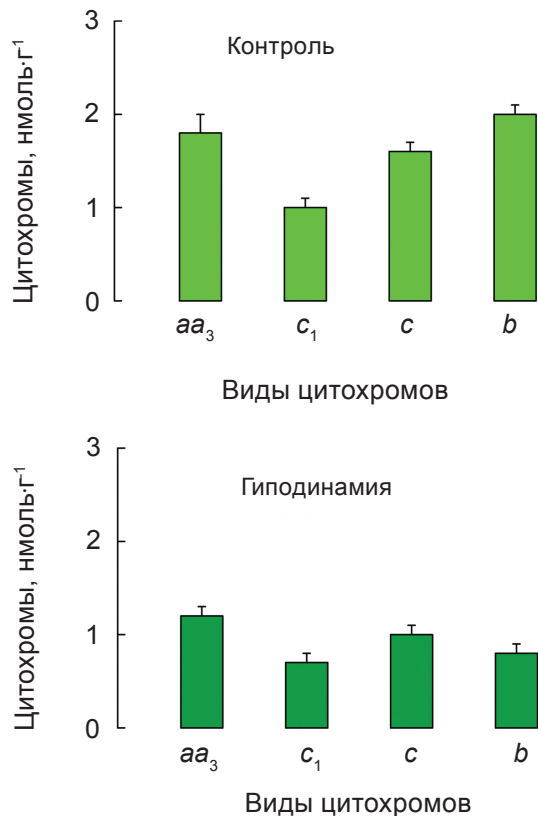


Рис. 5. Содержание цитохромов в белых скелетных мышцах пиленгаса в условиях экспериментальной гипокинезии

гипокинезия увеличивает число гипоксических зон в мышечной ткани рыб. Это приводит к формированию некомпенсированного типа стехиометрии цитохромов, что, по-видимому, является следствием функциональной адаптации, развивающейся на субклеточном уровне. Ранее подобная реакция была отмечена нами у кефали-сингиля в условиях экспериментальной гипоксии [22].

Таким образом, результаты, представленные в настоящей работе, позволяют заключить, что ограничение двигательной активности рыб приводит к увеличению числа гипоксических зон в мышечной ткани. Это сопровождается направленными функциональными и структурными перестройками дыхательной цепи митохондрий, которая приобретает некомпенсированный тип организации, выражающийся в увеличении доли терминальной группы пигментов  $aa_3$  на фоне общего снижения содержания цитохромов в мышцах.

## СТЕХІОМЕТРІЯ ЦИТОХРОМІВ І НАПРУГА КИСНЮ В СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗАХ МОРСЬКИХ РИБ

О. О. Солдатов<sup>1</sup>, І. О. Парфьонова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Інститут біології південних морів ім. О. О. Ковалевського НАН України, Севастополь; e-mail: alekssoldatov@yandex.ru;

<sup>2</sup>Таврійський національний університет ім. В. І. Вернадського, Сімферополь, Україна

Порівняли характер розподілу напруги кисню й особливості стехіометрії цитохромів у скелетних м'язах донних і пелагічних видів морських риб. Показано, що обмеження рухової активності призводить до збільшення числа гіпоксичних зон у м'язовій тканині. Електрон-транспортний ланцюг при цьому здобуває некомпенсований тип організації, що виражається в збільшенні частки термінального комплексу  $aa_3$  на тлі загального зниження вмісту цитохромів у м'язах. Реакція носить адаптивний характер і може бути реалізована в оксифільних видів риб в умовах експериментальної гіпокінезії.

**Ключові слова:** стехіометрія цитохромів, напруга кисню, скелетні м'язи, морські риби.

## STOICHIOMETRY OF CYTOCHROMES AND OXYGEN TENSION IN SKELETAL MUSCLES OF MARINE FISH

A. A. Soldatov<sup>1</sup>, I. A. Parfyonova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, National Academy of Science of Ukraine, Sevastopol; e-mail: alekssoldatov@yandex.ru;

<sup>2</sup>V. I. Vernadsky Taurida National University, Simferopol

The character of oxygen tension distribution and peculiarities of cytochromes stoichiometry in skeletal muscles of bottom and pelagic species of marine fish were compared. It is shown, that the limitation of muscle activity increases the number of hypoxic zones in the muscle tissue. The mitochondrial electron-transporting chain then obtain the uncompensated type of organization, expressed in the increase of the share of the terminal complex  $aa_3$  on the background of general reduction of cytochromes content in the muscles. The reaction is of an adaptive

character and can be implemented by pelagic fish species in conditions of experimental hypokinesia.

**Key words:** stoichiometry of cytochromes, oxygen tension, skeletal muscle, marine fish.

1. Middelburg J. J., Levin L. A. // Biogeosciences. – 2009. – **6**. – P. 1273–1293.
2. Gewin V. // Nature. – 2010. – **466**. – P. 812–814.
3. Waarde A. // Comp. Biochem. Physiol. – 1988. – **91B**. – P. 207–228.
4. Шульман Г. Е., Аболмасова Г. И., Столбов А. Я. // Усп. совр. биол. – 1993. – **113**. – С. 576–586.
5. Chew S. F., Gan J., Ip Y. K. // Physiol. Biochem. Zool. – 2005. – **78**. – P. 620–629.
6. Owen T. G., Hochachka P. W. // Biochem. J. – 1974. – **143**. – P. 541–553.
7. Mommsen Th. P., French C. J., Hochachka P. W. // Can. J. Zool. – 1980. – **58**. – P. 1785–1799.
8. Солдатов А. А. // Журн. еволюц. биохим. физиол. – 2006. – **42**. – С. 193–200.
9. Shulman G. E., Love R. M. The Biochemical Ecology and Marine Fishes / Adv. Mar. Biol. – London: Academic press, 1999. – **36**. – 347 p.
10. Солдатов А. А. // Журн. еволюц. биохим. физиол. – 1993. – **26**. – С. 656–659.
11. Houston A. H. Blood and circulation / Methods for fish biology. N-Y.: Amer. Fish. Society, 1990. – P. 273–334.
12. Солдатов А. А. // Гидробиол. журн. – 2003. – **39**. – С. 51–63.
13. Березовский В. А. Напряжение кислорода в тканях животных и человека. – Киев: Наук. думка, 1975. – 276 с.
14. Евдотиенко Ю. В., Мохова Е. Н. Механизмы дыхания, фотосинтеза и фиксации азота. – М.: Наука, 1967. – 154 с.
15. Van Handel P. J., Sandell W. R., Mole P. A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1977. – **27**. – P. 1213–1219.
16. Ребров О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTIKA. – М.: Медиа Сфера, 2002. – 305 с.
17. Belaud A., Trotter Y., Peyraud V. // J. Exp. Biol. – 1979. – **82**. – P. 321–330.
18. McKenzie D. J., Wong S., Randall D. J. et al. // J. Exp. Biol. – 2004. – **207**. – P. 3629–3637.
19. Белокопытин Ю. С. Энергетический обмен морских рыб. – Киев: Наукова думка, 1993. – 127 с.

20. *Kakuno A., Sezaki K., Ikeda Y.* // Bull. Natl. Res. Inst. Fish. Sci. Japan. – 1996. – **8**. – P. 15–27.
21. *Савина М. В.* Механизмы адаптации тканевого дыхания в эволюции позвоночных. – С.-Петербург: Наука, 1992. – 200 с.
22. *Солдатов А. А., Савина М. В.* // Журн. эволюц. биохим. физиол. – 2008. – **44**. – С. 508–512.

Получено 10.06.2013