

# СИСТЕМНЫЙ ГУМОРАЛЬНЫЙ И КЛЕТОЧНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ И ВАКЦИНАЦИИ

Донина С.А., Найхин А.Н., Петухова Г.Д.,  
Баранцева И.Б., Чиркова Т.В., Григорьева Е.П.,  
Рекстин А.Р., Руденко Л.Г.

ГУ Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН,  
Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Эталоним иммуногенности противовирусных вакцин, в том числе и гриппозных, служит иммунитет, возникающий после инфекции. Для оценки иммуногенных свойств вакцинных препаратов необходимо сравнение количественных и качественных параметров иммунного ответа на вакцинный штамм и вирулентный вирус, из которого он приготовлен. Однако такие исследования на людях затруднительны по этическим соображениям (заражение вирулентным вирусом).

Настоящая работа посвящена сопоставлению в экспериментальной модели системного иммунного ответа на патогенный для мышей вирус гриппа А (H1N1) и приготовленный на его основе аттенуированный реассортант с генетической формулой 2/6 (Р 2/6) – экспериментальный аналог вакцинного штамма для живой гриппозной вакцины (ЖГВ).

Показано, что Р 2/6 отставал от патогенного родительского вируса (ПРВ) в активности индукции циркулирующих IgG-антител, секреции спленоцитами Th1-маркерного цитокина IFN- $\gamma$  и продукции ЦТЛ (CD8<sup>+</sup>) в селезенке. В то же время Р 2/6 не уступал ПРВ по количественным характеристикам пролиферативной активности общего пула лимфоцитов селезенки, стимуляции Th (CD4<sup>+</sup>), В-клеток (CD19<sup>+</sup>) и Th2-цитокина IL-2. Оба вируса плохо индуцировали продукцию IL-6 спленоцитами.

Таким образом, аттенуация вируса гриппа А (H1N1) путем генетического реассортирования по формуле 2/6 влияет на индукцию разных звеньев системного иммунитета дифференцированно: одни показатели иммунного ответа могут быть снижены, другие – нет. Основное внимание при производстве вакцинных штаммов для ЖГВ должно быть уделено прежде всего повышению индукции циркулирующих антител – одного из важнейших звеньев противовирусного иммунитета.

*Ключевые слова:* системный иммунитет, гриппозная инфекция, вакцинация.

*Donina S.A., Naikhin A.N., Petukhova G.D., Barantseva I.B., Chirkova T.V., Grigor'eva E.P., Rekstin A.R., Rudenko L.G.*  
**SYSTEMIC ANTIBODY AND CELLULAR IMMUNE RESPONSES  
IN INFLUENZA INFECTION AND POST-VACCINATION**

**Abstract.** Post-infection immunity represents an immunogenicity standard for antiviral vaccines, including those against influenza. To estimate the immunogenic properties of vaccine preparations, it is necessary to compare the quantitative and qualitative parameters of immune responses to the vaccine strain and the virulent virus from which it is prepared. However, for ethical reasons, such human studies are difficult, because there is the possibility of pathogenic viral infection.

The aim of this experimental work was to compare systemic immune responses to the pathogenic mouse influenza virus A (H1N1), and an attenuated reassortant virus, genetic formula 2/6 (R 2/6), an experimental analogue to the live influenza vaccine.

**Адрес для переписки:**

Дониной С.А. 197376, Санкт-Петербург,  
ул. Акад. Павлова д.12, ГУ НИИЭМ РАМН,  
отдел вирусологии им. акад. А.А. Смородинцева.  
Тел.: 234-68-60, 234-42-92, факс 234-94-89.  
E-mail: vaccine@mail.ru

It was shown, that R 2/6 lagged behind the pathogenic parental virus (PPV) in activated induction of circulating IgG-antibodies, secretion of a marker Th1-cytokine IFN- $\gamma$  by splenocytes, and CTL (CD8<sup>+</sup>) production in the spleen. On the other hand, R 2/6 was highly competitive with PPV, with regard to quantitative proliferative parameters of pooled splenocytes, stimulation of Th (CD4<sup>+</sup>) cells, B-cells (CD19<sup>+</sup>), and Th2-cytokine IL-2. IL-6 production in the spleen was poorly induced by both viruses.

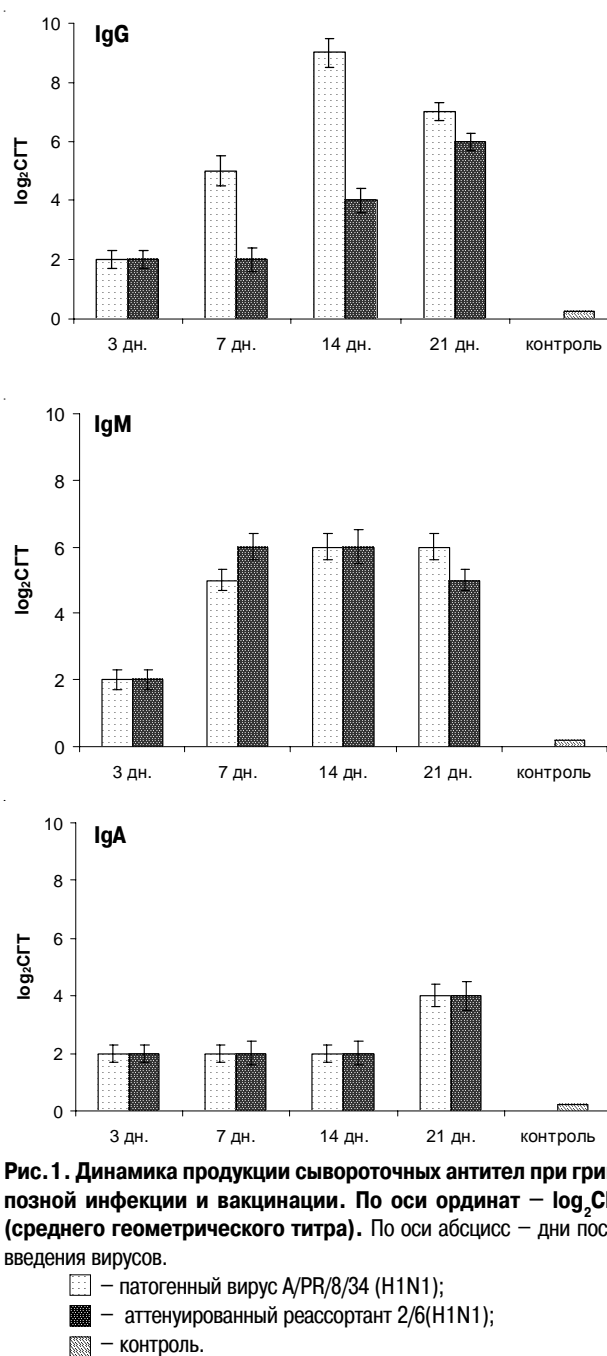
Thus, attenuation of influenza A (H1N1) virus by the 2/6 genetic reassortment differentially influences the induction of systemic immunity constituents. i.e., some parameters of immune response may be reduced, while others are not altered. When preparing vaccine strains for live influenza vaccines, an attention should be given first of all to increased induction of circulating antibodies that comprise the major components of antiviral immunity. (*Med. Immunol.*, 2006, vol.8, № 1, pp 31-36)

В настоящее время для профилактики гриппа используются два вида вакцин: инактивированные и живые аттенуированные реассортантные (ЖГВ). Эталоним иммуногенности любых вакцин, в том числе и гриппозных, служит иммунитет, возникающий при естественной инфекции [3]. Поэтому важно установить, в какой степени метод получения вакцинных штаммов влияет на индукцию разных звеньев иммунной защиты по отношению к вирулентному циркулирующему вирусу, из которого они приготовлены. Способ создания вакцинных штаммов для ЖГВ основан на генетической реассортации между вирулентным циркулирующим вирусом и донором аттенуации [1]. В результате реассортации вакцинные штаммы приобретают два гена поверхностных белков (гемагглютинина и нейраминидазы) от первого штамма и все гены внутренних белков (шесть) от второго. Как следствие, вакцинный штамм становится аттенуированным, то есть неспособным вызывать клинически выраженную инфекцию. Однако чрезмерная аттенуация вирусов гриппа может приводить к снижению их иммуногенности [1]. Поэтому важно знать, насколько оптимально соблюден баланс между этими двумя признаками. Проверить такой баланс можно путем сопоставления иммуногенной активности вакцинного штамма и его вирулентного родительского вируса. Проведение подобных исследований на людях весьма затруднительно по этическим соображениям (заражение вирулентным вирусом).

Настоящая работа посвящена сопоставлению в экспериментальной модели *in vivo* иммуногенных свойств (индукция системного иммунного ответа) патогенного для мышей вируса гриппа А (H1N1) и приготовленного на его основе аттенуированного реассортанта – экспериментального аналога вакцинного штамма для ЖГВ.

## Материалы и методы

**Животные:** Для воспроизведения гриппозной инфекции и вакцинации использовали 8 – 10 недельных мышей линии СВА.



**Рис. 1.** Динамика продукции сывороточных антител при гриппозной инфекции и вакцинации. По оси ординат – log<sub>2</sub>СГТ (среднего геометрического титра). По оси абсцисс – дни после введения вирусов.

□ – патогенный вирус А/PR/8/34 (H1N1);  
 ■ – аттенуированный реассортант 2/6(H1N1);  
 ▨ – контроль.

Табл. 1. ДИНАМИКА ПРОДУКЦИИ Th1- И Th2-МАРКЕРНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ И ВАКЦИНАЦИИ

| Вирусы                                 | Концентрация цитокинов (пг/мл) в надосадках культур спленоцитов, стимулированных вирусом А/PR/8/34 (H1N1) |       |        |        |       |       |        |        |       |       |        |        |
|--|---|-------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
|  | IFN- $\gamma$   |       |        |        | IL-2  |       |        |        | IL-6  |       |        |        |
|  | 3 дн.   | 7 дн. | 14 дн. | 21 дн. | 3 дн. | 7 дн. | 14 дн. | 21 дн. | 3 дн. | 7 дн. | 14 дн. | 21 дн. |
| Патогенный А/PR/8/34 (H1N1)            | 259   | 2498  | 453    | 723    | 240   | 330   | 330    | 150    | 334   | 250   | 224    | 245    |
| Аттенуированный реассортант 2/6 (H1N1) | 330   | 263   | 708    | 206    | 160   | 280   | 270    | 170    | 169   | 159   | 171    | 235    |
| Контроль                               | 213   | 239   | 205    | 165    | 150   | 130   | 150    | 180    | 178   | 213   | 205    | 227    |

**Модель:** Мышей заражали интраназально двумя вирусами гриппа А (H1N1) в дозах соответственно 4,0 lgЭИД<sub>50</sub>/0,1 мл и 6,0 lgЭИД<sub>50</sub>/0,1 мл: (i) высокопатогенным для них А/PR/8/34 – экспериментальным аналогом «дикого» вирулентного вируса; (ii) реассортантом 2/6, созданным по технологии приготовления вакцинных штаммов для ЖГВ: 2 гена поверхностных белков (гемагглютинин и нейраминидаза) от патогенного А/PR/8/34 (H1N1) и все гены внутренних белков от холодоадаптированного донора аттенуации А/Ленинград/134/47/57 (H2N2). По сравнению с патогенным родителем, аттенуированный реассортант реплицировался в легких гораздо хуже и не вызывал инфекции нижних дыхательных путей. В эксперименте этот вирус являлся аналогом вакцинного штамма для ЖГВ и моделировал вакцинацию.

В качестве контроля использовались незараженные животные. В каждую группу входило по 5 мышей.

**Антитела сыворотки крови** определяли в непрямом варианте иммуноферментного анализа (ИФА). На микропанели сорбировали вирусные антигены в дозе 20 АЕ/мл. Конъюгатом служили кроличьи антитела к IgA, IgM и IgG мыши, меченные пероксидазой хрена (Cappel, ISN Inc., США). В качестве субстрата применяли ортофенилендиамин (Sigma Co, США). Оптическую плотность (ОП) оценивали на спектрофотометре (Bio-Tec Instruments, Финляндия) при длине световой волны 420 нм. За титр антител принимали ОП последнего разведения сыворотки, превышающий ОП контроля (все ингредиенты реакции без исследуемого образца) в 2 и более раза.

**Пролиферативную активность лимфоцитов (ПАЛ) селезенки** оценивали по методу [11]. Двукратно отмытые лимфоциты селезенки ресуспендировали в полной среде RPMI-1640 (ООО «Биолот», Россия) и их взвесь ( $1 \cdot 10^6$  кл/мл) вносили по 50 мкл в 96-луночные планшеты для культур клеток (Sarstedt Co, США). Культуру лимфоцитов стимулировали инактивированным прогреванием при 56 °С 30 мин. вирусом А/PR/8/34 (H1N1). Через 72 ч. в культуры клеток вносили МТТ (Sigma, США) и инкубировали 4 ч при 37 °С. Далее добавляли по 100 мкл экстрагирующего раствора (0,04 N HCl в изоп-

кратно отмытые лимфоциты селезенки ресуспендировали в полной среде RPMI-1640 (ООО «Биолот», Россия) и их взвесь ( $1 \cdot 10^6$  кл/мл) вносили по 50 мкл в 96-луночные планшеты для культур клеток (Sarstedt Co, США). Культуру лимфоцитов стимулировали инактивированным прогреванием при 56 °С 30 мин. вирусом А/PR/8/34 (H1N1). Через 72 ч. в культуры клеток вносили МТТ (Sigma, США) и инкубировали 4 ч при 37 °С. Далее добавляли по 100 мкл экстрагирующего раствора (0,04 N HCl в изоп-

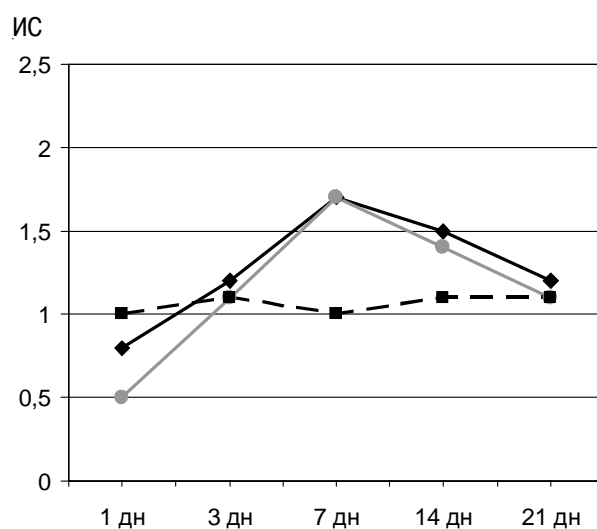


Рис. 2. Динамика пролиферативной активности лимфоцитов селезенки при гриппозной инфекции и вакцинации. По оси ординат – индексы стимуляции (ИС) лимфоцитов вирусом А/PR/8/34 (H1N1). По оси абсцисс – дни после введения вирусов.

—◆— патогенный вирус А/PR/8/34 (H1N1);  
—●— аттенуированный реассортант 2/6 (H1N1);  
—■— контроль.

ропанол). ОП учитывали на спектрофотометре при длине световой волны 570 нм. Индекс стимуляции лимфоцитов определяли по соотношению: ОП лунок с исследуемым материалом/ОП лунок с полной средой RPMI-1640.

**Мембранные маркеры лимфоцитов.** Процент  $CD4^+$  (Т-хелперов – Th),  $CD8^+$  (цитотоксических лимфоцитов – ЦТЛ) и  $CD19^+$  (В-лимфоцитов) оценивали в проточной цитофлуориметрии (Becton Dickinson, FACS-calibur, США) с помощью набора меченых FITC моноклональных антител мыши (PharMingen Co, США).

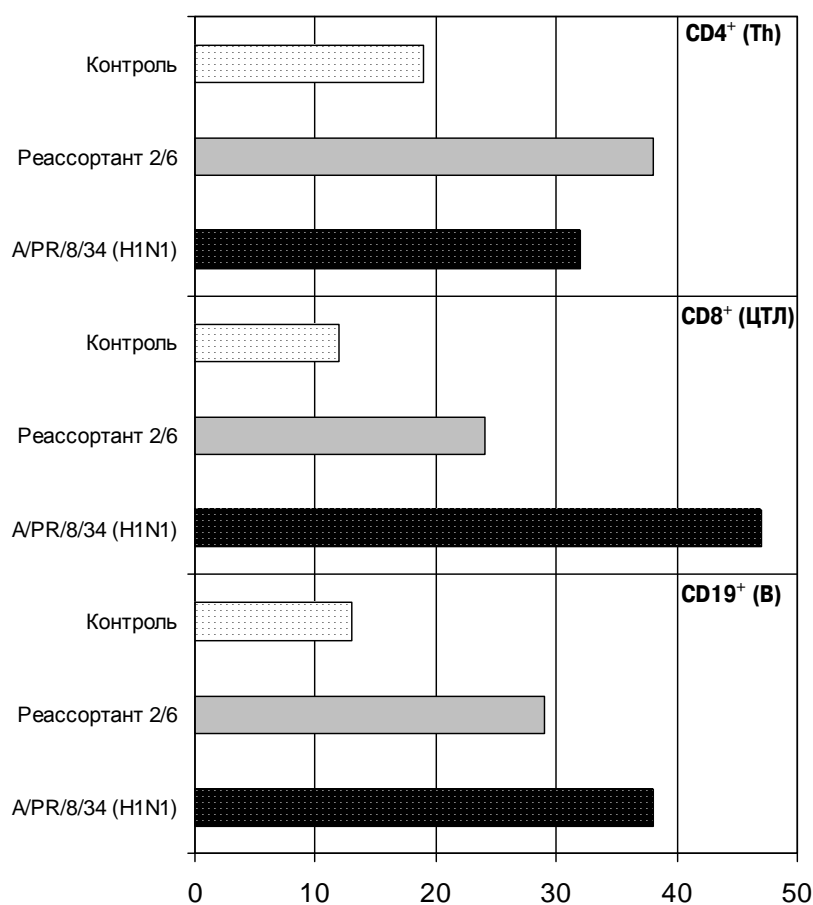
**Уровень интерферона- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), интерлейкина-2 (IL-2) и интерлейкина-6 (IL-6)** определяли в супернатантах трехдневных культур лимфоцитов, стимулированных инактивированным вирусом гриппа A/PR/8/34 (H1N1), используя стандартные коммерческие наборы для тестирования в иммуноферментном анализе мышинных цитокинов (BD Biosciences Pharmingen, США).

**Статистические методы.** Статистическую достоверность результатов, полученных в экспериментальных и контрольных группах животных, оценивали по критерию Стьюдента. Достоверным считали показатель  $p < 0,05$ .

## Результаты

Рисунок 1 содержит данные о динамике продукции сывороточных антител разных классов после введения мышам патогенного вируса A/PR/8/34 и аттенуированного реассортанта 2/6. Все вирусы активно индуцировали IgG- и IgM-, но не IgA-антитела. Патогенный вирус более интенсивно, чем аттенуированный реассортант стимулировал накопление IgG-антител. В динамике выработки антител класса G, M и A, индуцированных этими вирусами, не отмечено существенных отличий, за исключением одной позиции: титры IgG-антител после введения патогенного вируса достигали максимального значения на 14-й день, а реассортанта 2/6 – на 21-й день.

Рисунок 2 отражает данные о формировании клеточного иммунного ответа в селезенке тех же мышей на изучаемые вирусы. Через сутки после заражения обоими штаммами отмечена кратковременная супрессия ПАЛ (через 48 часов она исчезала – данные не приведены). На седьмые сутки наблюдался пик пролиферативной активности лимфоцитов селезенки в обеих группах. Значения индексов стимуляции лимфоцитов у зараженных мышей возрос-



**Рис.3.** Количество  $CD4^+$ -,  $CD8^+$ - и  $CD19^+$ -спленоцитов при гриппозной инфекции и вакцинации. По оси абсцисс – % от числа сортированных клеток (10 тыс.) в проточной цитофлуориметрии на 7 день после введения вирусов.

ли по отношению к контролю в 1,6 – 1,7 раза ( $p < 0,001$ ). В целом динамика пролиферативной активности лимфоцитов при введении аттенуированного реассортантного вируса и его патогенного родителя была практически одинаковой.

На рисунке 3 представлены сведения о стимуляции теми же вирусами конкретных популяций спленоцитов на пике пролиферативной активности лимфоцитов селезенки (7 день). Оба штамма вызывали достоверное увеличение ( $p < 0,01$  и  $< 0,001$ ) процентного содержания  $CD4^+$ -,  $CD8^+$ - и  $CD19^+$ -клеток, но кратность их прироста по отношению к контрольным показателям варьировала. Так, после введения патогенного вируса А/PR/8/34 доля  $CD8^+$ -лимфоцитов увеличилась в 3,9 раза ( $p < 0,001$ ), а аттенуированного реассортанта 2/6 только в 2,0 раза ( $p < 0,001$ ). Уровни  $CD4^+$ - и  $CD19^+$ -клеток после заражения патогенным вирусом и реассортантом не имели достоверных отличий.

В таблице 1 представлены данные о динамике продукции спленоцитами Th1 (IFN $\gamma$ , IL-2)- и Th2 (IL-6)-маркерных цитокинов в ответ на введение мышам изучаемых вирусов. Оба штамма активно индуцировали Th1-цитокины, но определенное преимущество в стимуляции IFN $\gamma$  имел патогенный вирус. Так, в этом случае средняя кратность превышения показателей в опытной группе по отношению к контрольной для патогенного штамма составила 4,6 ( $p < 0,001$ ), а для аттенуированного реассортанта 1,9 ( $p < 0,01$ ). Кроме того, после введения патогенного вируса высокий уровень выработки IFN $\gamma$  сохранялся вплоть до 21 дня после заражения (срок наблюдения). Не было отмечено достоверных отличий в способности стимулировать IL-2 патогенным и аттенуированным штаммами (средняя кратность прироста в опытной группе по отношению к контрольной, соответственно, 1,8 и 1,5 –  $p < 0,05$ ). Штаммовые отличия в динамических изменениях продукции цитокинов наблюдали только в отношении IFN $\gamma$  (для патогенного вируса пиковые значения на 7-ой день, для аттенуированного реассортанта – на 14-ый день). Что касается продукции IL-6, то и патогенный вирус, и аттенуированный реассортант не вызывали достоверного увеличения уровня этого цитокина во все временные интервалы за исключением 3 дня после введения патогенного штамма.

## Обсуждение

Одним из важнейших факторов противогриппозного иммунитета являются циркулирующие антитела, нейтрализующие возбудитель в межклеточном пространстве и опсонизирующие зараженные клетки-мишени [9]. Нами показано, что аттенуированный реассортант 2/6 отставал от патогенного родителя А/PR/8/34 в активности индукции IgG-антител (рис. 1). Аналогичные результаты получены в

отношении этих штаммов при определении у мышей антигемагглютинирующих антител в реакции торможения гемагглютинации [2]. Кроме того, по нашим данным реассортант 2/6 хуже, чем патогенный родительский вирус вызывал синтез специфических IgG-антителосекретирующих В-клеток в селезенке [6]. Таким образом, наши и литературные данные свидетельствуют, что патогенный вирус, вызывающий гриппозную инфекцию и являющийся родителем для вакцинного реассортантного штамма, имел преимущество перед ним в индукции системного гуморального иммунного ответа.

Другим важным звеном противовирусной защиты является клеточный иммунитет, участвующий непосредственно в элиминации возбудителя и опосредованно в активации гуморального иммунного ответа [8]. Общее состояние клеточного противогриппозного иммунитета принято оценивать по показателям пролиферации общего пула лимфоцитов после их специфической стимуляции *in vitro* вирусными антигенами [7]. Нами установлено отсутствие каких-либо существенных отличий в количественных характеристиках ПАЛ у мышей после введения аттенуированного реассортанта 2/6 и его патогенного родителя А/PR/8/34 (H1N1) (рис. 2). Это свидетельствует, что принятый при производстве ЖГВ способ аттенуации вируса с помощью генетической реассортации по формуле 2/6 практически не снижает по отношению к родительскому патогенному штамму количественные параметры клеточного системного иммунного ответа, опосредованного пролиферативной активностью спленоцитов. Важно отметить, что в этом случае поствакцинальный клеточный иммунный ответ был приближен к эталону – постинфекционному иммунному ответу. Ранее показана способность ЖГВ активно повышать ПАЛ у людей [5].

Нами отмечено возникновение индуцируемой обоими вирусами кратковременной иммуносупрессии ПАЛ на раннем этапе их репликации – 24 часа (рис. 2). По-видимому, этот феномен связан со способностью репликативной формы вирусов гриппа А запускать апоптоз клеток лимфоидного ряда в той же временной точке [4]. Поскольку продолжительность такой супрессии очень незначительна (не более одних суток), иммунологическая безопасность ЖГВ от этого вряд может страдать.

Далее мы попытались охарактеризовать системный пролиферативный иммунный ответ с точки зрения антигенной активации наиболее значимых в противогриппозном иммунитете популяций лимфоцитов:  $CD4^+$  (Th),  $CD8^+$  (ЦТЛ) и  $CD19^+$  (В-клеток) (рис. 3). Хотя количественные показатели пролиферативной активности общего пула спленоцитов после введения изученных штаммов были близки по значению (рис. 2), имелись определенные отличия в индукции этими штаммами перечисленных выше

клеток. Так, аттенуированный реассортант 2/6 не уступал патогенному родителю в активности стимуляции в селезенке Th и В-клеток, но хуже чем патогенный штамм индуцировал ЦТЛ. Эти результаты хорошо согласуются с ранее полученными экспериментальными данными о пониженной способности аттенуированного реассортанта 2/6 по отношению к патогенному родительскому вирусу повышать функциональную активность ЦТЛ, фиксируемую в классическом функциональном тесте с применением радиоактивной метки [6].

В настоящей работе показано, что оба вируса активно индуцировали в селезенке продукцию Th1-маркерных цитокинов IFN $\gamma$  и IL-2, хотя аттенуированный реассортант уступал патогенному родителю в стимуляции IFN $\gamma$ . Обращает на себя внимание отсутствие стимуляции обоими вирусами Th2-маркерного цитокина IL-6. К сожалению, мы не обнаружили литературных данных о выработке IL-6 спленocyтaми мышей в подобных условиях. В то же время имеются сведения об очень слабой продукции другого Th2-маркерного цитокина IL-4 при иммунизации гриппозными вакцинами [4, 10]. Отсутствие секреции IL-4 или IL-6 при стимуляции лимфоцитов вирусами гриппа, свидетельствует не о супрессии Th2-иммунного ответа, а, скорее, о сниженных индуктивных способностях этого вируса в отношении данных цитокинов.

Обобщая представленные данные, можно отметить следующее: впервые проведено сопоставление способности аттенуированного реассортанта 2/6 (экспериментальный аналог вакцинного штамма для ЖГВ) и его генетического родителя (патогенный вирус А/PR/8/34 (H1N1)) индуцировать в селезенке мышей системный гуморальный и клеточный иммунный ответ.

Установлено, что аттенуация вируса гриппа А (H1N1) путем генетического реассортирования по формуле 2/6 влияет на индукцию разных звеньев этого вида иммунитета дифференцированно: по отношению к постинфекционному иммунному ответу на патогенный родительский вирус одни показатели иммунного ответа на реассортант могут быть снижены (выработка циркулирующих антител, индукция ЦТЛ и IFN $\gamma$ ), другие – нет (активность пролиферации общего пула лимфоцитов, стимуляция IL-2, Th и В-клеток). В целом же такое отставание было не столь уж значительным и вовсе не свидетельствует о наличии крупного иммунологического недостатка ЖГВ, поскольку в вакцинальной иммунологии иммунный ответ на

инфекцию является практически недостижимым качественным эталоном.

## Список литературы

1. Александрова Г.И., Климов А.И. Живая вакцина против гриппа. – Санкт-Петербург: Наука. – 1994. – 151 с.
2. Егоров А.Ю., Гармашова Л.М., Неведомская Г.Н. Иммуногенность для мышей аттенуированный реассортантов вируса гриппа А/Ленинград/134/47/57 (H2N2) в зависимости от состава их генома. – Вопросы вирусологии. – 1994. - № 5. – с. 198 – 201.
3. Медуницын Н.В. Вакцинология. – Москва: Триада-Х. – 1999. – 272 с.
4. Найхин А.Н., Рекстин А.Р., Баранцева И.Б., Донина С.А., Дешева Ю.А., Григорьева Е.П., Киселева И.В., Руденко Л.Г. Иммунный ответ на живую гриппозную вакцину. – Вестник РАМН. 2002. – № 12. – с. 24-28.
5. Найхин А.Н., Рекстин А.Р., Кац Дж., Донина С.А., Григорьева Е.П., Дешева Ю.А., Арден Н., Руденко Л.Г., Кокс Н. Пролиферативная активность лимфоцитов лиц пожилого возраста *in vitro* при раздельной и сочетанной иммунизации живой и инактивированной гриппозными вакцинами. – Вопросы вирусологии. – 2000. – № 2. – с. 41-45.
6. Рекстин А.Р., Найхин А.Н., Баранцева И.Б., Руденко Л. В-клеточный и цитотоксический лимфоцитарный иммунный ответ на патогенные, аттенуированные и реассортантные вирусы гриппа. – Вопросы вирусологии. – 2002. - № 4. – с. 27-32.
7. Bradley L.M. Cell proliferation. Selected methods in cellular immunology. – San Francisco. – 1980. – p. 153-161.
8. Doherty P.C. T-cells and viral infection. – Brit. Med. Bull. – 1985. – Vol. 41. – p. 7-14.
9. James E. Crowe. The role of antibodies in respiratory viral immunity. – Seminars Virol. – Vol. 7. – 1996. – p. 273-283.
10. Jones H.P., Hodge L.M., Fujihashi K., Kiyono H., McGhee J.R., Simecka J.W. The Pulmonary environment promotes Th2 cell responses after nasal-pulmonary immunization with antigen alone, but Th1 responses are induced during instances of intense immune stimulation. – J. Immunol. – 2001. – Vol. 167. – p. 4518-4526.
11. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular-growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J. Immunol. Meth. – 1983. - Vol.65. – P.55-63.

поступила в редакцию 12.12.2005  
отправлена на доработку 22.12.2005  
принята к печати 28.12.2005