

А.Н. Гребенюк¹, В.А. Башарин¹, Р.А. Тарумов¹,
В.Л. Пастушенков², В.Ю. Ковтун³

Экспериментальная оценка влияния синтетического генистеина на динамику гематологических и биохимических показателей периферической крови крыс

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

²Научно-исследовательский институт детских инфекций, Санкт-Петербург

³Научно-производственный центр «Фармзащита», Химки Московская область

Резюме. В опытах на белых беспородных крысах изучена фармакодинамика отечественного синтетического генистеина по гематологическим и биохимическим показателям периферической крови. После однократного внутривенного введения крысам генистеина в дозе 200 мг/кг оценивали количество эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов в крови, а также концентрацию общего белка, холестерина, глюкозы, мочевины, креатинина, β -эстрадиола, интерлейкина-1, интерлейкина-2, интерлейкина-6, активность аспаратаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы в сыворотке. Установлено, что генистеин не оказывал значимого влияния на содержание форменных элементов крови у экспериментальных животных в течение 28 сут наблюдения. Введение генистеина не изменяло также состояния углеводного и белкового обмена в организме животных. Однако через 1 ч после введения генистеина уровень холестерина в сыворотке крови крыс снижался на 24% по сравнению с контролем. Содержание интерлейкина-1 через 1 ч после введения генистеина повышалось на 26%, а интерлейкина-6 – на 14%. Через 24 ч после введения генистеина содержание интерлейкина-1 было на 32%, а интерлейкина-6 – на 30% выше, чем в контроле. Выявлено стимулирующее влияние генистеина на синтез и продукцию β -эстрадиола, содержание которого в сыворотке крови крыс через 1 ч после введения препарата было более чем в 2 раза выше по сравнению с контролем. Обсуждаются перспективы дальнейшего изучения фармакологических свойств препарата и сферы его возможного применения.

Ключевые слова: генистеин, фармакодинамика, периферическая кровь, клетки крови, биохимические показатели, цитокины, эстрадиол, крысы.

Введение. В настоящее время изофлавоноид сои генистеин, полученный из природных источников растительного происхождения, широко применяется в медицинской практике при лечении ряда онкологических заболеваний [17, 18], в кардиологии [21], при профилактике остеопороза в период постменопаузы у женщин [19]. Кроме того, генистеин рассматривается в качестве перспективного радиопротектора при воздействии ионизирующего облучения [13, 16, 24].

Весьма интересным является тот факт, что для генистеина, по данным экспериментальных наблюдений, характерно наличие антиоксидантных свойств, стимулирующее влияние на продукцию цитокинов, а также умеренная эстрогенная активность [20]. Кроме того, препарат обладает и другими биологическими эффектами: регулирует пролиферацию и дифференцировку клеток, повышает сопротивляемость организма при химиотерапии, индуцирует апоптоз опухолевых клеток, подавляет ангиогенез новообразований и проявляет умеренные противовоспалительные свойства [11].

Однако природный генистеин дорог в производстве, которое, в свою очередь, не позволяет дать выход продукта с достаточно низким содержанием примесей. В Научно-производственном центре (НПЦ)

«Фармзащита» Федерального медико-биологического агентства (ФМБА) (г. Химки, Московская область) был синтезирован 4,5,7-тригидроксиизофлавоноид (генистеин), производство которого на порядок дешевле иностранного аналога. В проведенных ранее исследованиях нами установлено, что отечественный синтетический генистеин по структуре полностью соответствует природному аналогу, является малотоксичным соединением и обладает антиоксидантными свойствами [2, 4]. Однако сведения о влиянии синтетического генистеина на гематологические и биохимические показатели крови экспериментальных животных как данные, характеризующие фармакодинамику препарата и, соответственно, механизм его действия, в литературе не представлены.

Цель исследования. Изучить фармакодинамику синтетического генистеина по гематологическим и биохимическим показателям периферической крови крыс после введения им синтетического генистеина.

Материалы и методы. Экспериментальное исследование выполнено на 54 белых беспородных крысах-самцах массой 180–200 г из питомника Российской академии медицинских наук «Рапполово».

Животные содержались в виварии и получали стандартный пищевой рацион. При проведении исследования выполняли требования нормативно-правовых актов о порядке экспериментальной работы с использованием животных [5].

Изученный в экспериментах синтетический препарат – генистеин, синтезированный в НПЦ «Фармзащита» ФМБА России, представлял собой кристаллический порошок светло-желтого цвета, который перед введением растворяли в 60% растворе диметилсульфоксида. Препарат в дозе 200 мг/кг вводили внутрибрюшинно. Объем вводимого животным раствора генистеина составлял 0,1 мл на 100 г массы тела животного. Особям контрольной группы тем же способом и в том же объеме вводили растворитель. Была также сформирована группа биологического контроля – интактные животные.

Влияние генистеина на гематологические показатели оценивали по динамике общего содержания лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов в периферической крови белых беспородных крыс-самцов на 1, 3, 7, 15, 21 и 28 сут после введения препарата. Кровь у животных из хвостовой вены забирали в пробирки «Эппендорф» с 5 мкл 10% раствора Со-ЭДТА. Подсчет форменных элементов проводили пробирочным методом [6].

Влияние генистеина на биохимические показатели изучали через 1, 3, 24 и 72 ч после введения препарата путем определения в сыворотке крови крыс концентрации общего белка, холестерина, глюкозы, мочевины, креатинина, активности аспаратаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ). В эти же сроки определяли содержание в сыворотке крови животных β -эстрадиола и провоспалительных цитокинов – интерлейкина-1 (ИЛ-1), интерлейкина-2 (ИЛ-2) и интерлейкина-6 (ИЛ-6). Забор материала после декапитации животных производили в пластиковые пробирки «Vacuette» (Австрия), содержащие активатор свертывания. Кровь отстаивали в течение 30 мин. при температуре +4°C, а затем центрифугировали при 3000 об./мин в течение 10 мин. После

центрифугирования сыворотку отбирали пипеткой в пробирки типа «Эппендорф», а затем немедленно использовали в работе.

Содержание общего белка, холестерина, глюкозы, мочевины, креатинина, активности АЛТ и АСТ в сыворотке крови крыс определяли на биохимическом анализаторе «BS-120» фирмы «Mindray» (Китай) с помощью набора кассет реактивов «Ольвекс» (Россия). Исследование содержания в сыворотке крови β -эстрадиола проводили методом ферментативно-усиленной хемилюминесценции на анализаторе «Immulite 2000» фирмы «Siemens Healthcare Diagnostics Inc.» (Соединенные Штаты Америки). Определение ИЛ-1, ИЛ-2 и ИЛ-6 в сыворотке крови крыс проводили на анализаторе «Multiskan Spectrum» фирмы «Thermo» (Финляндия) с использованием реактивов «Вектор-Бест» (Россия).

Полученные в ходе экспериментальных исследований данные с помощью пакета прикладных программ «Statistica 6,0» были подвергнуты статистической обработке с расчетом среднего значения, ошибки средней и среднего квадратического отклонения. Оценку различий средних значений данных при распределениях, близких к нормальным, проводили параметрическим методом с использованием t-критерия Стьюдента. Вероятность $p \leq 0,05$ и выше считали достаточной для вывода о статистической значимости различий полученных данных.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что внутрибрюшинное введение синтетического генистеина в дозе 200 мг/кг не оказывает достоверного влияния на содержание форменных элементов крови у экспериментальных животных в течение 28 сут наблюдения (табл. 1). Учитывая это, полагаем, что механизм его фармакологического действия напрямую не связан с модификацией системы гемопоеза.

Выявлено, что генистеин в тех же дозах не изменяет концентрацию общего белка, мочевины и креатинина (исследуемые показатели не выходили за пределы физиологической нормы). Кроме того,

Таблица 1

Влияние внутрибрюшинного введения генистеина в дозе 200 мг/кг на гематологические показатели периферической крови белых беспородных крыс-самцов (n=6), $X \pm m_x$

Показатель	Группа	Сутки после введения препарата					
		1	3	7	15	21	28
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	Интактные	8,17 \pm 0,54					
	Контроль	9,48 \pm 0,88	9,10 \pm 0,85	8,48 \pm 0,73	8,90 \pm 0,80	9,37 \pm 0,57	8,44 \pm 0,39
	Генистеин	8,99 \pm 0,92	8,63 \pm 0,75	9,16 \pm 0,39	9,62 \pm 0,70	8,89 \pm 0,64	8,27 \pm 0,29
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	Интактные	12,83 \pm 0,93					
	Контроль	10,5 \pm 1,2	12,8 \pm 0,97	12,63 \pm 0,56	12,6 \pm 0,83	11,5 \pm 0,75	12,46 \pm 0,59
	Генистеин	11,0 \pm 0,56	12,6 \pm 0,84	12,75 \pm 0,75	12,72 \pm 0,98	10,99 \pm 0,82	11,34 \pm 0,87
Тромбоциты, $\times 10^9/л$	Интактные	885,1 \pm 35,7					
	Контроль	920,3 \pm 68,3	901,6 \pm 85,5	904,7 \pm 98,7	912,4 \pm 69,3	915,0 \pm 88,0	908,8 \pm 75,5
	Генистеин	900,8 \pm 87,9	882,0 \pm 91,2	920,4 \pm 85,0	892,6 \pm 81,8	917,0 \pm 94,2	905,8 \pm 78,5

на фоне ведения крысам генистеина показатели активности ферментов АЛТ и АСТ, которые участвуют в обмене белков и являются маркерами цитолиза [1], также не отклонялись от референтных значений для этих величин (табл. 2).

Полученные данные позволяют предположить, что введение синтетического генистеина не нарушает процесс обновления белков в организме [8], а также не приводит к повреждению клеток. Также показано, что на фоне введения крысам генистеина изменений содержания в сыворотке крови глюкозы как маркера, отражающего состояние углеводного обмена [9], не обнаружено.

Через 1 ч после введения препарата уровень холестерина в сыворотке крови крыс снизился на 24% ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем, что может свидетельствовать о гипохолестеринемических свойствах генистеина. Подобные результаты были получены J. Demonthy, B. Lamarche, P.J.H. Jones [12]. Авторы полагают, что наблюдаемый эффект на фоне приема генистеина достигался за счет увеличения

числа клеточных рецепторов к липопротеидам низкой плотности, в результате чего происходил интенсивный переход холестерина в клетку из сосудистого русла. Кроме того, через 1 ч после внутрибрюшинного введения генистеина также отмечалось статистически значимое ($p \leq 0,05$) повышение содержания β -эстрадиола в сыворотке крови более чем в 2 раза по сравнению с контролем. Однако через 4, 24 и 72 ч после введения препарата значимых отличий содержания β -эстрадиола в сыворотке крови у животных, получавших генистеин и крыс контрольной группы обнаружено не было (табл. 3).

Наблюдаемый эффект может быть обусловлен влиянием препарата на снижение синтеза в печени глобулина, связывающего половые гормоны (ГСПГ). Известно, что изофлавоноиды могут не только ингибировать связывание эстрогенов или андрогенов с ГСПГ, увеличивая таким образом уровень свободно циркулирующих гормонов, но и увеличивать синтез гепатоцитами самого ГСПГ [10]. В то же время существуют данные о влиянии природного генистеина на

Таблица 2

Влияние внутрибрюшинного введения генистеина в дозе 200 мг/кг на биохимические показатели сыворотки крови белых беспородных крыс-самцов ($X \pm m_x$, $n=6$)

Время после введения препарата, ч	Группа	Показатель						
		общий белок, г/л	мочевина, ммоль/л	креатинин, мкмоль/л	АЛТ, Ед/л	АСТ, Ед/л	глюкоза, ммоль/л	холестерин, ммоль/л
–	Интактные	75,2±6,0	10,9±1,9	58,7±1,7	102,5±9,8	386,6±26,7	4,7±0,23	1,8±0,1
1	Контроль	74,2±8,1	8,29±0,2	59,9±1,3	100,2±20,2	315,6±47,5	4,4±0,34	2,0±0,06
	Генистеин	76,5±7,2	11,3±2,5	64,2±6,7	110,0±8,9	332,9±40,5	4,8±0,56	1,5±0,1*
4	Контроль	75,0±5,0	8,87±1,0	72,0±7,1	111,0±12,6	319,3±22,3	4,9±0,44	1,4±0,09
	Генистеин	67,8±9,3	6,17±0,4	56,8±1,9	93,98±9,7	345,0±45,2	5,1±0,87	1,5±0,1
24	Контроль	74,8±5,1	10,8±1,1	65,1±5,9	119,51±9,2	395,9±43,8	4,5±0,32	2,0±0,16
	Генистеин	72,3±6,3	8,43±0,4	60,9±2,1	110,0±10,7	404,0±41,1	4,2±0,25	1,8±0,1
72	Контроль	75,1±5,9	7,97±0,8	62,5±1,6	68,27±4,1	312,5±28,5	4,5±0,94	1,9±0,1
	Генистеин	69,8±6,4	9,25±0,7	64,9±1,8	74,8±7,7	346,0±48,7	4,5±0,34	2,0±0,0

Примечание: * – $p \leq 0,05$.

Таблица 3

Влияние генистеина на содержание β -эстрадиола, ИЛ-1, ИЛ-2 и ИЛ-6 в сыворотке крови белых беспородных крыс-самцов, пг/мл ($X \pm m_x$, $n=6$)

Время после введения препарата, ч	Группа	Показатель			
		β -эстрадиол	ИЛ-1	ИЛ-2	ИЛ-6
–	Интактные	26,1±2,7	105,3±4,8	131,8±5,24	18,4±1,5
1	Контроль	24,1±1,9	107,1±13,5	124,4±8,5	22,2±2,1
	Генистеин	73,4±7,0*	144,0±3,6*#	132,5±5,7	25,4±1,8#
4	Контроль	26,8±1,8	115,5±18,9	110,4±8,7	20,05±2,3
	Генистеин	31,0±3,5	151,1±10,7#	143±9,7*	26,6±2,0#
24	Контроль	28,0±2,1	95,2±8,8	117,4±15,0	17,7±1,5
	Генистеин	25,1±2,0	139,7±8,0*#	119,5±6,0	23,4±2,5*
72	Контроль	27,1±3,3	105,5±10,1	121,7±3,9	20,7±1,1
	Генистеин	32,8±2,5	136,9±2,7*#	135,1±3,0*	21,0±1,9

Примечание: # – отличие от группы «интактные»; * – от группы «контроль», $p \leq 0,05$.

активность ароматазы – фермента, который катализирует превращение андрогенов в эстрогены. Показано, что при инкубации клеток генистеином в концентрации 10 мМ в течение 24 ч активность фермента увеличивается на 50% по сравнению с контролем [25].

Выявлено, что уже через 1 ч после внутрибрюшинного введения генистеина в дозе 200 мг/кг в сыворотке крови крыс наблюдалось достоверное ($p \leq 0,05$) увеличение на 26% по сравнению с контролем содержания ИЛ-1 – основного стимулятора костномозгового кроветворения [7, 13]. Через 24 и 72 ч после применения препарата, было также отмечено достоверное ($p \leq 0,05$) увеличение ИЛ-1 на 32 и 23% соответственно, по сравнению с контролем.

Применение генистеина сопровождалось также значимым повышением концентрации сывороточного ИЛ-2 к 4 и 72 ч исследования (на 30 и 15% соответственно, $p \leq 0,05$) по сравнению с контролем. При этом значимых отличий исследуемого показателя от группы интактных животных в другие сроки наблюдения обнаружено не было. Через 1 ч после введения генистеина содержание ИЛ-6 в сыворотке крови крыс увеличилось на 14%, а через 24 ч на 30% относительно группы контроля.

Полученные данные в целом согласуются с результатами исследований V.K. Singh и соавт. [22], из которых видно, что подкожное введение мышам генистеина в дозе 200 мг/кг за 24 ч до острого облучения сопровождалось повышением уровня в сыворотке крови животных гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора на 15% и ИЛ-6 на 35% уже через 4 ч после радиационного воздействия по сравнению с контролем. По мнению авторов, это обстоятельство может явиться объяснением более раннего восстановления численности функциональных клеток системы кроветворения у животных, которые получали генистеин в условиях воздействия радиации. Известно, что радиозащитный эффект противовоспалительных цитокинов определяется их гемо- и иммуностимулирующей активностью, а также связан с их способностью повышать эндогенный фон радиорезистентности до нескольких суток [3, 7, 14, 23].

Таким образом, дальнейшее изучение фармакодинамики генистеина необходимо для разработки схем профилактики и патогенетической терапии острой лучевой болезни и коррекции цитопенического синдрома радиационной природы. Кроме того, выявленные гипохолестеринемические и эстрогенные свойства препарата позволяют найти ему применение и в обычной медицинской практике.

Выводы

Однократное внутрибрюшинное введение генистеина в дозе 200 мг/кг белым беспородным крысам не вызывает достоверных изменений общего числа эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов в периферической крови.

Введение генистеина в тех же дозах не изменяет состояние углеводного и белкового обмена, но сни-

жает на 24% уровень холестерина в сыворотке крови через 1 ч после его введения.

Через 1 ч после внутрибрюшинного введения генистеина в дозе 200 мг/кг содержание β -эстрадиола повысилось более чем в 2 раза, ИЛ-1 – на 26%, ИЛ-6 – на 14%. Через 24 ч уровень ИЛ-1 увеличился на 32%, а ИЛ-6 – на 30% по сравнению с контрольной группой.

Литература

1. Баишева, Г.М. Молекулярные механизмы формирования нарушений метаболизма при гиперферментемии: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Г.М. Баишева – Уфа, 2001. – 41 с.
2. Гребенюк, А.Н. Изучение антиоксидантных свойств отечественного синтетического генистеина на модели *in vitro* и *in vivo* / А.Н. Гребенюк [и др.] // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. – 2013. – № 2 (42). – С. 83–87.
3. Гребенюк, А.Н. Противолучевые свойства интерлейкина-1 / А.Н. Гребенюк, К.Г. Саркисян, А.А. Тимошевский // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. – 2005. – № 1 (13). – С. 44–53.
4. Гребенюк, А.Н. Экспериментальное исследование острой токсичности генистеина в опытах на мелких лабораторных животных / А.Н. Гребенюк [и др.] // Токсикол. вестн. – 2012. – № 6 (116). – С. 25–29.
5. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. – СПб.: Rus-LASA «НП объединение специалистов по работе с лабораторными животными», рабочая группа по переводам и изданию тематической литературы, 2012. – 48 с.
6. Зупанец, И.А. Клиническая лабораторная диагностика: методы исследования / И.А. Зупанец [и др.]. Харьков: Золотые страницы, 2005. – 200 с.
7. Кетлинский, С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев – СПб.: Фолиант, 2008. – 552 с.
8. Мак-Мюррей, У. Обмен веществ у человека: основы учения и взаимосвязи биохимии с физиологией и патологией / пер. с англ. В.З. Горкина. – М.: Мир, 1980. – 368 с.
9. Талаева, Е.В. Роль гипергликемии и нарушений обмена глюкозы как фактора развития синдрома инсулинорезистентности / Е.В. Талаева [и др.] // Укр. кардіол. журн. – 2009. – Т. 3, № 1. – С. 51–61.
10. Шепельская, Н.Р. Фитоэстрогены сои и их антиандрогенное действие (обзор литературы) / Н.Р. Шепельская, М.Г. Проданчук // Проблемы харчування. – 2010. – № 3–4. – С. 593–598.
11. Banerjee, S. Multi-targeted therapy of cancer by genistein / S. Banerjee [et al.] // Cancer lett. – 2008. – Vol. 269. – P. 226–242.
12. Demonthy, J. Role of isoflavones in hypocholesterolemic effect or soy / J. Demonthy, B. Lamarche, P.J.H. Jones // Nutr. rev. – 2003. – Vol. 61. – P. 189–203.
13. Gardner, R.V. Hemopoietic function after use of IL-1 with chemotherapy or irradiation / R.V. Gardner [et al.] // J. immunol. – 2003. – Vol. 171. – P. 1202–1206.
14. Grebenyuk, A. Effects of early therapeutic administration of interleukin-1 β on survival rate and bone marrow haemopoiesis in irradiated mice / A. Grebenyuk [et al.] // Acta medica (Hradec Kralove). – 2010. – Vol. 53, № 4. – P. 221–224.
15. Landauer, M.R. Genistein treatment protects mice from ionizing radiation injury / M. Landauer, V. Srinivasan, T. Seed // J. appl. toxicol. – 2003. – Vol. 23. – P. 379–385.
16. Landauer, M.R. Protection against lethal irradiation by genistein / M.R. Landauer [et al.] // Int. j. toxicol. – 2000. – № 19. – P. 37–43.
17. Li, Z. Genistein induces G2/M cell cycle arrest via stable activation of ERK1/2 pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells / Z. Li [et al.] // Cell. biol. toxicol. – 2008. – Vol. 24, № 5. – P. 401–409.

18. Pan, H. Genistein inhibits MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell growth by inhibiting NF- κ B activity via the Notch-1 pathway / H. Pan [et al.] // Int. j. mol. med. – 2012. – Vol. 30, № 2. – P. 337–343.
19. Persky, V.W. Effect of soy protein on endogenous hormones in postmenopausal women / V.W. Persky [et al.] // Am. j. clin. nutr. – 2002. – Vol. 75. – P. 145–153.
20. Polkowski, K. Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data / K. Polkowski, A.P. Mazurek // Acta pol. pharm. – 2000. – Vol. 57, № 2. – P. 135–155.
21. Rishi, R.K. Phytoestrogens in health and illness / Rishi, R.K. // Ind. j. pharmacol. – 2002. – Vol. 34. – P. 311–320.
22. Singh, V.K. Effects of genistein administration on cytokine induction in whole-body gamma irradiated mice / V.K. Singh [et al.] // Int. immunopharmacol. – 2009. – Vol. 9, № 12. – P. 1401–1410.
23. Singh, V.K. Role of cytokines and growth factors in radioprotection / V.K. Singh, V.S. Yadav // Exp. mol. pathology. – 2005. – Vol. 78 – P. 156–169.
24. Song, L.H. Protective effects of soybean isoflavone gamma-irradiation induced damages in mice / L.-H. Song, H.-L. Yan, D.-L. Cai // J. radiat. res. – 2006. – Vol. 47. – P. 157–165.
25. Ye, L. The soy isoflavone genistein induces estrogen synthesis in an extragonadal pathway / L. Ye [et al.] // Mol. cell endocrinol. – 2009. – Vol. 302. – P. 73–80.

A.N. Grebenyuk, V.A. Basharin, R.A. Tarumov, V.L. Pastushenkov, V.Yu. Kovtun

Experimental estimation of synthetic genistein action on dynamics of hematological and biochemical parameters of peripheral blood of rats

Abstract. Hematological and biochemical parameters have been studied after single intraperitoneal administration of genistein (200 mg/kg b.w.) to rats. Number of erythrocytes, leukocytes and platelets in the blood, and serum concentrations of total protein, cholesterol, glucose, urea, creatinine, β -estradiol, interleukin-1, interleukin-2, interleukin-6, the activity of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase were determined. The content of blood cells in experimental animals in 28 days after administration has not changed significantly. Level of cholesterol in genistein-injected rats decreased by 24% in 1 hour after injection. Content of interleukin-1 increased by 26% and IL-6 increased by 14% in 1 hour after administration of genistein. In 24 hour after genistein injection content of interleukin-1 was by 32%, and interleukin-6 was by 30% higher than its concentrations in the control group. Stimulatory effect of genistein on the synthesis and production of β -estradiol content in blood serum of rats was identified. β -estradiol content was more than 2 times higher than its concentrations in control group in 1 hour after administration of genistein. The prospects of further studies of the pharmacological properties of genistein and the field of its possible applications are discussed.

Key word: genistein, pharmacodynamics, peripheral blood, blood cells, biochemical parameters, cytokines, estradiol, rats.

Контактный телефон: 8 (812) 955-49-02; e-mail: tarumov_ra@mail.ru