

Рус.УДК: 57.083.3

Иммунологическая характеристика тимуса у морской свинки

Евстропов Владимир Михайлович

Донской государственный технический университет, Ростов-на-Дону, Россия;
v.evstr@mail.ru

Аннотация:

Известно, что разные субклассы клеток тимуса могут выполнять различные иммунологические функции. Это связано в значительной степени и со зрелостью тимоцитов. Учитывая наличие факта возрастной инволюции тимуса и существенную роль вилочковой железы в созревании Т-клеток, а также широкое применение морских свинок в качестве различных экспериментально-иммунологических моделей, целью исследования являлось изучение у морских свинок различного возраста клеток вилочковой железы некоторых субклассов, имеющих иммунологическое значение, у животных разного возраста (первая группа – возраст 3-4 недели, вторая группа – средний возраст 3 месяца). Изучалось содержание в тимусе этих морских свинок тимоцитов с рецепторами к агглютину арахиса (PNA⁺-клетки); E-РОК, идентифицированных спонтанным розеткообразованием с эритроцитами кролика; EAC-РОК – в розеткообразовании с эритроцитами кролика, покрытых антителами и комплементом; T_μ -timoцитов – розеткообразованием с эритроцитами быка (EA-PO), нагруженными IgM- фракцией специфических антител, а также T_γ клеток – розеткообразованием с эритроцитами быка, нагруженными IgG - фракцией, специфических антител. Показано, что для характеристики возрастных различий тимуса морской свинки могут применяться методы определения в вилочковой железе клеток различных субклассов, имеющих иммунологическое значение, в частности – T_γ-клеток и PNA⁺-клеток.

Ключевые слова: тимус, иммунологическая характеристика, субклассы тимоцитов, цитокины, иммунитет, возраст, онтобиологические процессы старения.

Eng. *Immunological characteristics of thymus in guinea pig*

Evstropov Vladimir M.

Don state technical University, Rostov-on-Don, Russia

Abstract:

It is known that different subclasses of thymus cells can perform different immunological functions. This is largely due to the maturity of thymocytes. Given the fact of age-related involution of the thymus and the significant role of the thymus gland in T-cell maturation, as well as the widespread use of guinea pigs as various experimental immunological models, the aim of the study was to study some subclasses of immunological significance in guinea pigs of different ages. in animals of different ages (the first group - the age of 3-4 weeks, the second group - the average age of 3 months). The thymocytes with peanut agglutinin receptors (PNA + cells) in the thymus of these guinea pigs were studied; E-ROCK identified by spontaneous rosette formation with rabbit erythrocytes; EAC-ROCK - in rosette

formation with rabbit erythrocytes coated with antibodies and complement; T μ thymocytes — by rosette formation with bovine erythrocytes (EA-PO) loaded with an IgM fraction of specific antibodies, and T γ cells — by rosette formation with bovine erythrocytes loaded with an IgG fraction of specific antibodies. It was shown that to characterize age-related differences in guinea pig thymus, methods can be used to determine in the thymus gland cells of various subclasses that have immunological significance, in particular, T γ cells and PNA + cells.

Keywords: thymus, immunological characteristics, subclasses of thymocytes, cytokines, immunity, age, ontobiological aging processes.

Введение

В экспериментальном биомоделировании наблюдается некоторая «специализация», т.е. преимущественное использования животных одних видов – для одних целей, животных других видов – для других, что связано с целевым применением этих животных в связи с использованием различных элементов их биосистем. Морских свинок часто используют для изучения аллергических реакций, а также – для изучения авитаминоза С и туберкулеза. Кроме того, статус здоровья лабораторных животных, в том числе и морских свинок, является важным элементом качественного эксперимента [9]. Тимус играет важную роль в статусе здоровья, являясь центральным органом Т-звена иммунной защиты [2,3].

Известно, что с в процессе онтогенеза формируется ассоциированное с возрастом физиологическое уменьшение количества клеток в тимусе – возрастная инволюция [15]. В частности, у половозрелых крыс породы Вистар относительное содержание CD3 + - лимфоцитов в тимусе несколько выше, чем содержание этих клеток в тимусе крыс препубертатного периода. CD3 – один из маркеров Т-лимфоцитов [10].

Вокруг крупных сосудов в тимусе располагаются различные типы клеток, в основном это Т-лимфоциты, но встречаются также В-лимфоциты, плазматические клетки, эозинофилы, нейтрофилы, гистиоциты, тучные клетки [20]. Среди популяций лимфоцитов в тимусе обнаружены гемопоэтические предшественники CD117+ и зрелые CD4+ и CD8+ Т-клетки [27].

Разные субклассы клеток тимуса могут выполнять различные иммунологические функции. Предполагают, что Т γ -лимфоциты являются Т-супрессорами, а Т μ -лимфоциты – Т-хелперами [1]. Другие маркеры Т-лимфоцитов могут свидетельствовать о различной степени зрелости этих клеток. В частности, PNA⁺ - Т-лимфоциты менее зрелые, чем PNA⁻ - Т-лимфоциты [29].

Цель исследования

Учитывая наличие факта возрастной инволюции тимуса и существенную роль вилочковой железы в созревании Т-клеток, а также широкое применение

морских свинок в качестве различных экспериментально-иммунологических моделей, целью исследования являлось изучение у морских свинок различного возраста клеток вилочковой железы некоторых субклассов, имеющих иммунологическое значение.

Материалы и методы исследования

Для решения поставленной задачи использовали 2 группы морских свинок. Первая группа включала животных массой 190—225 г. (возраст 3—4 недели), вторая группа – морских свинок массой 410—430 г (средний возраст 3 месяца). Работы проводились в соответствии с рекомендациями по содержанию и использованию в эксперименте лабораторных животных [7].

Извлеченный у эвтаназированных животных тимус гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе, гомогенат фильтровали и отмывали центрифугированием в среде 199.

Тимоциты с рецепторами к агглютинуину арахиса (PNA⁺-клетки) определяли при помощи данного маркера, меченного ФИТЦ. Е-РОК идентифицировали методом спонтанного розеткообразования с эритроцитами кролика, для выявления ЕАС-РОК используемые в розеткообразовании эритроциты кролика предварительно покрывали антителами и комплементом [17]. Для индикации T_μ и T_γ-тимоцитов сначала выделяли из суспензии тимоцитов Т-клетки, путем розеткообразования клеток тимуса с эритроцитами кролика с последующим лизисом этих эритроцитов. Полученные Т-клетки использовали для выявления T_μ-клеток розеткообразованием их с эритроцитами быка (ЕА-РО), нагруженными IgM- фракцией специфических антител, а также – для определения T_γ клеток (розеткообразованием с эритроцитами быка, нагруженными IgG – фракцией, специфических антител) [1,4].

Процентное содержание Е-, и ЕАС-РОК определяли в клеточной взвеси, нанесенной на предметное стекло [5]. Эти препараты фиксировали этиловым спиртом и окрашивали по Романовскому-Гимза. Полученные при подсчете данные статистически обработаны, достоверность различий показателей определялась в соответствии с t-критерием Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования показали количественное доминирование Е-РОК среди изучаемых тимоцитов (Таблица 1), количество ЕАС-РОК было незначительным. Среди субклассов тимоцитов чаще определялись PNA⁺-клетки. Реже идентифицировались T_γ- и T_μ-клетки. Примечательно, что у морских свинок более старшего возраста снижается содержание в тимусе клеток субклассов T_γ и PNA⁺.

Тимические В-лимфоциты имеют фенотип зрелых или активированных В-клеток и составляют приблизительно лишь 1–2% всех клеток тимуса [26].

Согласно таблице 1 содержание в тимусе морских свинок EAC-РОК, характеризующихся как В-клетки, также незначительно. Предполагают, что В-клетки в вилочковой железе участвуют в негативной селекции аутореактивных клонов Т-клеток [22].

Таблица 1. Популяции Т- и В- клеток тимуса у морских свинок различного возраста ($M \pm m$)

№ группы	EAC-РОК	E-РОК	Т γ -клетки	Т μ -клетки	PNA ⁺ -клетки
1 (=6)	0,83±0,34	51,1±1,37	3,33±0,61	4,3±0,54	78,75±2,19
2 (=8)	1,13±0,13	64,1±2,24	6,38±0,78*	4,25±0,84	69,5±1,88*

*Примечание: * - статистически достоверное отличие показателя второй группы от аналогичного показателя первой группы ($p < 0,05$).*

В тимусе происходит формирование пространственных рецепторов Т-лимфоцитов [6]. Для основной субпопуляции Т-лимфоцитов, $\alpha\beta$ Т-клеток, классическим путем дифференцировки является тимический. В тимусе Т-клеточные предшественники приобретают рецептор для антигена (TCR) и, вследствие этого, проходят процессы клональной селекции, связанные с элиминацией потенциально аутореактивных лимфоцитов и обеспечивающие толерантность зрелых периферических Т-клеток к антигенам собственного организма [11]. Мембранным маркером, отражающим осуществленную положительную селекцию, является для CD4⁺ CD8⁺ $\alpha\beta$ Т-клеток экспрессия активационной молекулы CD69. Затем происходит отрицательная селекция, предотвращающая выход в периферический отдел иммунной системы потенциально аутоагрессивных клеток [19].

Тимическая дифференцировка $\alpha\beta$ Т-клеток включает последовательные этапы:

- а) коммитирование полипотентных костномозговых предшественников к Т-ряду;
- б) формирование рецептора для антигена (реаранжировка β -цепи TCR, образование пре-TCR, несколько волн клональной экспансии, иницируемой сигналом с пре-TCR, формирование полноценного TCR);
- в) клональная селекция на основании TCR, предполагающая отбор Т-клеток, распознающих чужеродные антигенные пептиды в контексте собственных молекул главного комплекса гистосовместимости [21, 22].

Примерно 90–95% Т-лимфоцитов в периферической крови составляют $\alpha\beta$ Т-лимфоциты, которые разделяются на две основные субпопуляции: 1-я – CD4⁺ обеспечивают развитие Т-клеточного иммунного ответа (Т-хелперы), 2-я – CD8⁺ являются преимущественно цитотоксическими [13].

Дифференцировка Т-клеток в тимусе характеризуется их фенотипическими изменениями, прежде всего – изменением экспрессии мембранных молекул CD4 и CD8: у ранних внутритимусных предшественников обе молекулы отсутствуют, на более поздней стадии они экспрессируются одновременно, а последующая дифференцировка сопровождается

утратой одного из маркеров [24,25].

Функциональная роль клеток тимического ряда включает и продукцию цитокинов, причем небольшое количество цитокинов могут секретировать незрелые CD4⁻ и CD8⁻ клетки-предшественники (IL-2, IL-4, IL-7 и др.). Более зрелые тимоциты фенотипа CD4⁻ и CD8⁺ продуцируют больше цитокинов (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 и др.), особенно тимоциты CD4⁺ и CD8⁻ (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 и др.). Достаточно зрелые тимоциты фенотипа CD4⁺ и CD8⁺ секретируют мало цитокинов (IL-4 и др.), а на завершающей стадии созревания у тимоцитов CD3^{lo} CD4⁺ и CD8⁺ продукция цитокинов прекращается вообще [18, 23]. Установлено, что, в свою очередь сами цитокины, в частности, IL-1 и IL-6 способствуют дифференцировке CD4⁺-Т-клеток в Th17, а IL-2 и IL-23 модулируют дифференцировку Th17, которые продуцируют IL-17, 21, 22 [14].

Онтобиологические процессы старения совпадают с биологическим возрастом. Исходя из этого, процесс старения в целом необходимо рассматривать как изменения, характеризующие уровень адаптации организма к условиям существования в различные возрастные периоды [14]. Экспериментальные и клинические исследования в области геронтологии показали, что первой из функциональных систем, поражающейся при старении, является система иммунитета [12, 27].

При этом следует отметить, что возрастная жировая инволюция вилочковой железы хронологически синхронизирована с возрастной жировой трансформацией костного мозга длинных трубчатых костей. В тимусе, как и в костном мозге, всегда сохраняются стволовые клетки, способные при необходимости пролиферировать. Сходство возрастных изменений тимуса и костного мозга предполагает возможную общность регуляции, обуславливающую оба процесса, и тесную функциональную связь между тимико-лимфатической и кроветворной системой [8,28]. Поэтому можно полагать, что возрастные изменения тимуса в существенной степени отражают и возрастные изменения иммунитета в целом.

Заключение

Таким образом, для иммунологической характеристики тимуса и его возрастных различий у морской свинки могут применяться методы определения в вилочковой железе клеток различных субклассов, имеющих иммунологическое значение и характеризующих его иммунологическую структуру, в частности – T_γ-клеток и PNA⁺-клеток.

Список литературы

1. Джаманова Г.И. Активность бесклеточной надосадочной фракции культуры сенсibilизированных лимфоцитов на P₀ интактных лимфоцитов и их

- субпопуляций // Вестник Алтайского государственного аграрного университета, 2007. № 7. – С.38—40.
2. Евстропов В.М. Феномен различной реактивности тимуса и костного мозга при локальном воздействии дециметровых волн // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры, 1987. №6. – С. 14—17.
 3. Евстропов В.М., Силич И.Н. Фазозависимость иммуномодулирующего эффекта при облучении дециметровыми волнами центральных органов иммунной системы // Иммунология, 1988. Т. 9. № 6. – С. 37—40.
 4. Евстропов В.М. Мелихова О.Н., Ковалева Г.В. Костномозговые Т-и В-лимфоциты при локальном воздействии дециметровыми волнами (экспериментальное исследование) // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры, 1986. № 6. – С.24—26.
 5. Евстропов В.М. Приготовление клеточной взвеси на стекле //Лабораторное дело, 1983. №.2. – С. 54.
 6. Евстропов В.М. Иммуно-эндокринная реакция на локальное воздействие дециметровых волн. Фрунзе: Илим, 1987. –104 с.
 7. Западнюк И. П., Западнюк В. И., Захария Е. А., Западнюк Б.В. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. Киев: Вища школа. Головное изд-во, 1983. – 383 с.
 8. Ивановская Т.Е., Катасонова Л.П. Структура тимуса, иммунный статус и патологический процесс //Архив патологии, 1986. Т.48. Вып.1. – С. 3—9.
 9. Исламов Р.А. Организация мониторинга здоровья лабораторных животных // Вестник Казахского национального медицинского университета, 2016. №3. – С.174—178.
 10. Косырева А.М., Макарова О.В., Осмоловская Е.Ю. Возрастные особенности и половые различия морфофункциональных изменений тимуса у крыс Вистар при системном воспалительном ответе // Клиническая и экспериментальная морфология, 2016. №1. – С.18—26.
 11. Куклина Е.М., Глебездина Н.С. Экстратимическая дифференцировка $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов // Онтогенез, 2015. Т. 46, № 4. – С. 209—224.
 12. Кузьменко Л.Г., Киселева Н.М., Симонова А.В. Старение и тимус // Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке», 2013. Т.15, №1—4. – С.170—175.
 13. Москалев А.В, Гумилевский Б.Ю., Апчел А.В., Цыган В.Н. Т-лимфоциты – «цензорные» клетки иммунной системы // Вестник Российской Военно-медицинской академии, 2019. №2. – С.191—197.
 14. Москалев А.В., Рудой А.С., Цыган В.Н., Апчел В.Я. Аутоиммунные заболевания. Диагностика и лечение. М.: Гэотар-Медиа, 2017. – 218 с.
 15. Старская И.С., Полевщиков А.В. Морфологические аспекты атрофии тимуса при стрессе // Иммунология, 2013. №5. – С.271—277.
 16. Фролькис В.В., Ступина А.С., Шумский Н.Г. Старость, старение // БМЭ, Изд-е 3-е. Т. 24. – С. 205—213.

17. Шварцман М.Я., Кашкин А.П. Определение количества Т- и В- лимфоцитов у морских свинок // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1982. №9. – С.85—87.
18. Ярилин А.А. Цитокины в тимусе. Выработка и рецепция цитокинов // Цитокины и воспаление, 2003. №1. – С.3—12.
19. Ярилин А.А. Донецкова А.Д. Т-клетки – недавние эмигранты из тимуса // Иммунология, 2012. № 6. – С.326—334.
20. Bearman R.M. The normal human thymic vasculature: An ultrastructural study / R.M. Bearman, K.G. Bensch, G.D. Levine // Anat. Rec., 1975. 183 (4): 485-497.
21. Bellamy D. The Thymus in relation to problems of cellular growth and aging // Gerontologia, 1973. Vol. 19. – P. 162—184.
22. Ferrero I., Anjuère F., Martin P. et al. Functional and phenotypic analysis of thymic B cells: role in the induction of T cell negative selection // Eur. J. Immunol., 1999; 29 (5): 1598—609.
23. Hong C., Luckey M.A., Park J.H. Intrathymic IL-7: the where, when, and why of IL-7 signaling during T cell development // Semin. Immunol., 2012. V. 24(3). P. 151—158.
24. Koch U., Radtke F. Mechanisms of T cell development and transformation // Cell. Immunol., 2011. V. 27. P. 539—562.
25. Kondo M., Shah D.K., Zuniga-Pflucker J.C. An overview of the intrathymic intricacies of T cell development // J. Immunol., 2014. V. 192(9). P. 4017—4023.
26. Masrcos M.A., Andreu J.L., Alonso J.M. et al. Physiological significance of thymic B lymphocytes: An appraisal. // Res. Immunol., 1989; 140 (3): 275—279.
27. Mori K., Itoi M., Tsukamoto N. et al. The perivascular space as a path of hematopoietic progenitor cells and mature T cells between the blood circulation and the thymic parenchyma // Int. Immunol., 2007; 19 (6): 745—753.
28. Naito T., Tanaka H., Naoe Y. et al. Transcriptional control of T-cell development // Int. Immunol., 2011. V. 23 (11). P. 661—668.
29. Schuurman H. J., Brekelmans P., Daemen T., Broekhuizen R., Kater L. T-cell maturation in the human thymus and tonsil: peanut agglutinin binding T lymphocytes in thymus and tonsil differ in maturation stage // Clinical immunology and immunopathology, 1983. V.29. – P.271—281.

Spisok literatury

1. Dzhamanova G.I. Aktivnost' beskletochnoj nadosadochnoj frakcii kul'tury sensibilizirovannyh limfocitov na Ro intaktnyh limfocitov i ih subpopulyacij // Vestnik Altajskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, 2007. № 7. – S.38-40.
2. Evstropov V.M. Fenomen razlichnoj reaktivnosti timusa i kostnogo mozga pri lokal'nom vozdejstvii decimetrovyyh voln // Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoj fizicheskoj kul'tury, 1987. №6. – S. 14-17.
3. Evstropov V.M., Silich I.N. Fazozavisimost' immunomoduliruyushchego effekta pri obluchenii decimetrovymi volnami central'nyh organov immunnoj sistemy // Immunologiya, 1988. T. 9. № 6. – S. 37-40.

4. Evstropov V.M. Melihova O.N., Kovaleva G.V. Kostnomozgovye T-i V-limfocity pri lokal'nom vozdejstvii decimetrovymi volnami (eksperimental'noe issledovanie) // Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoj fizicheskoj kul'tury, 1986. № 6. – S.24-26.
5. Evstropov V.M. Prigotovlenie kletочноj vzvesi na stekle //Laboratornoe delo, 1983. №.2. – S 54.
6. Evstropov V.M. Immuno-endokrinnaya reakciya na lokal'noe vozdejstvie decimetrovych voln. Frunze: Ilim,1987. –104 s.
7. Zapadnyuk I. P., Zapadnyuk V. I., Zahariya E. A., Zapadnyuk B.V. Laboratornye zhivotnye. Razvedenie, sodержание, ispol'zovanie v eksperimente. Kiev: Vishcha shkola. Golovnoe izd-vo,1983. – 383 s.
8. Ivanovskaya T.E., Katasonova L.P. Struktura timusa, immunnyj status i patologicheskij process //Arhiv patologii, 1986. T.48. Vyp.1. – S. 3-9.
9. Islamov R.A. Organizaciya monitoringa zdorov'ya laboratornyh zhivotnyh // Vestnik Kazahskogo nacional'nogo medicinskogo universiteta, 2016. №3. – S.174-178.
10. Kosyreva A.M., Makarova O.V., Osmolovskaya E.YU. Vozrastnye osobennosti i polovye razlichiya morfofunkcional'nyh izmenenij timusa u krysv Vistar pri sistemnom vospalitel'nom otvete // Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya, 2016. №1. – S.18-26.
11. Kuklina E.M., Glebezdina N.S. Ekstratimicheskaya differencirovka $\alpha\beta$ T-limfocitov // Ontogenez, 2015. T. 46, № 4. – S. 209-224.
12. Kuz'menko L.G., Kiseleva N.M., Simonova A.V. Starenie i timus // ZHurnal nauchnyh statej «Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke», 2013. T.15, №1-4. – S.170-175.
13. Moskalev A.V, Gumilevskij B.YU., Apchel A.V., Cygan V.N. T-limfocity – «cenzornye» kletki immunnoj sistemy // Vestnik Rossijskoj Voenno-medicinskoj akademii. – 2019. – №2. – S.191-197.
14. Moskalev A.V. Autoimmunnye zabolevaniya. Diagnostika i lechenie / A.V. Moskalev [i dr.]. M.: Geotar-Media, 2017. – 218 s.)
15. Starskaya I.S., Polevshchikov A.V. Morfologicheskie aspekty atrofii timusa pri stresse // Immunologiya, 2013. №5. – S.271-277.
16. Frol'kis V.V., Stupina A.S., SHumskij N.G. Starost', starenie // BME, Izd-e 3-e. T. 24. – S. 205-213.
17. SHvarcman M.YA., Kashkin A.P. Opredelenie kolichestva T- i V- limfocitov u morskikh svinok // Byulleten' eksperimental'noj biologii i medeciny, 1982. №9. – S.85-87.
18. YArilin A.A. Citokiny v timuse. Vyrabotka i recepciya citokinov // Citokiny i vospalenie, 2003. №1. – S.3-12.
19. YArilin A.A. Doneckova A.D. T-kletki – nedavnie emigranty iz timusa // Immunologiya, 2012. № 6. – S.326-334.
20. Bearman R.M. The normal human thymic vasculature: An ultrastructural study / R.M. Bearman, K.G. Bensch, G.D. Levine // Anat. Rec.,1975. 183 (4): 485-497.

21. Bellamy D. The Thymus in relation to problems of cellular growth and aging // *Gerontologia*, 1973. Vol. 19. – P. 162-184.
22. Ferrero I., Anjuère F., Martin P. et al. Functional and phenotypic analysis of thymic B cells: role in the induction of T cell negative selection // *Eur. J. Immunol.*, 1999; 29 (5): 1598–609.
23. Hong C., Luckey M.A., Park J.H. Intrathymic IL-7: the where, when, and why of IL-7 signaling during T cell development // *Semin. Immunol.*, 2012. V. 24(3). P. 151-158.
24. Koch U., Radtke F. Mechanisms of T cell development and transformation // *Cell. Immunol.*, 2011. V. 27. P. 539-562.
25. Kondo M., Shah D.K., Zuniga-Pflucker J.C. An overview of the intrathymic intricacies of T cell development // *J. Immunol.*, 2014. V. 192(9). P. 4017-4023.
26. Masrcos M.A., Andreu J.L., Alonso J.M. et al. Physiological significance of thymic B lymphocytes: An appraisal. // *Res. Immunol.*, 1989; 140 (3): 275–9.
27. Mori K., Itoi M., Tsukamoto N. et al. The perivascular space as a path of hematopoietic progenitor cells and mature T cells between the blood circulation and the thymic parenchyma // *Int. Immunol.*, 2007;19 (6): 745–53.
28. Naito T., Tanaka H., Naoe Y. et al. Transcriptional control of T-cell development // *Int. Immunol.*, 2011. V. 23 (11).P. 661-668.
29. Schuurman H. J., Brekelmans P., Daemen T., Broekhuizen R., Kater L. T-cell maturation in the human thymus and tonsil: peanut agglutinin binding T lymphocytes in thymus and tonsil differ in maturation stage // *Clinical immunology and immunopathology*, 1983. V.29. – R.271-281.