

# ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ КАК ИНДУКТОРЫ АУТОИММУННЫХ ПРОЦЕССОВ У ЧЕЛОВЕКА И ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

*М.С. Красильщикова, О.В. Зацепина*

*Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

Аутоиммунные болезни относятся к одним из наиболее распространенных заболеваний в мире. В развитых странах они занимают третье место по частоте встречаемости, проявляясь у 5 – 8% населения [33, 62]. В подавляющем большинстве случаев (около 80%) аутоиммунные болезни поражают женщин вне зависимости от их возраста [33].

Несмотря на продолжающиеся в течение многих лет исследования, точные причины возникновения аутоиммунных болезней до сих пор остаются неизвестными. Установлено, что развитие этих заболеваний индуцируют генетическая предрасположенность [80] и такие экзогенные факторы, как инфекции и лекарственные препараты [31, 34, 82]. К индукторам аутоиммунных болезней относятся также ксенобиотики (от греч. *xenos* – чужой и *bios* – жизнь) – вещества, чужеродные для организма, среди которых особое место занимают тяжелые металлы и их соединения [5]. Тяжелые металлы могут попадать в организм из загрязненной окружающей среды, вместе с продуктами питания и питьевой водой; в последнее время участились случаи добавления соединений тяжелых металлов в косметические средства [56, 57, 64, 70, 81]. С развитием антропогенных факторов риск интоксикации тяжелыми металлами и их соединениями постоянно растет, что является одной из причин активного изучения роли этих химических веществ в индукции аутоиммунной патологии у человека [24, 35, 68, 77, 87] и лабораторных животных [20, 40, 44, 62, 71, 78, 94, 95].

## ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ.

### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

При кажущейся ясности понятия «тяжелые металлы» его значение следует определить более четко из-за встречающихся в литературе неоднозначных толкований. Как правило, в качестве критериев принадлежности химических элементов таблицы Д.И. Менделеева к тяжелым металлам используются различные характеристики, включая атомную массу, плотность, токсичность, распространенность в природной среде, степень вовлеченности в природные и техногенные циклы.

В работах, посвященных проблемам загрязнения окружающей природной среды и экологического мониторинга, к тяжелым металлам принято относить элементы с атомной массой свыше 50 единиц и плотностью более 8 г/см<sup>3</sup> [9]. По этим признакам к тяжелым металлам причисляют ртуть (Hg), кадмий (Cd), свинец (Pb), никель (Ni), медь (Cu), цинк (Zn), хром (Cr), драгоценные металлы – серебро (Ag), золото (Au) и платину (Pt), а также мышьяк (As) – элемент, обладающий некоторыми свойствами неметаллов [3]. Соединения этих металлов, как правило, легко проникают в клетки, обладают высокой биологической активностью (токсичностью) и потому представляют серьезную опасность для здоровья человека [1, 3, 49].

Тяжелые металлы и их соединения попадают в окружающую среду в результате антропогенной деятельности человека. Так, ртуть в небольшом количестве содержится в каменном угле, нефти, торфе и при их сжигании может поступать в воздух. Она применяется в приборостроении и электротехнике, химической промышленности; ртуть-органические соединения являются действующим началом соответствующих пестицидов. Мышьяк широко применяется в металлургии, нефтяной и химической промышленности, стоматологии и гомеопатии; свинец – в химическом машиностроении, в производстве аккумуляторов, красок, в книгопечатании; кадмий и его сплавы используют в авиационном и автомобилестроении, ядерной промышленности. В отличие от других ксенобиотиков, тяжелые металлы резистентны к процессам разрушения и потому способны долго сохраняться в окружающей среде [6].

В организм человека тяжелые металлы попадают через органы дыхания и кожу, а также с пищей и водой через желудочно-кишечный тракт. Все тяжелые металлы токсичны для живых организмов при повышении их предельно допустимых концентраций (ПДК), устанавливаемых органами санитарно-эпидемиологического надзора. Согласно существующим нормам, ПДК содержания в воде ртути составляют 0,0005 мг/л, кадмия – 0,001 мг/л, свинца – 0,03 мг/л, мышьяка – 0,05 мг/л; ПДК остальных металлов находятся в пределах, установленных для свинца и мышьяка [10]. Из этих цифр видно, что ртуть относится к одним из наиболее опасных для человека тяжелых металлов.

На молекулярном уровне токсичность тяжелых металлов проявляется, прежде всего, в способности денатурировать клеточные белки, изменяя тем самым их основные функции: транспортную, структурную и энзиматическую. В основе денатурации лежит повреждение внутривеликовых связей, поддерживающих вторичную и третичную структуру протеина. При этом тиоловые яды, такие как ртуть, мышьяк, сурьма, таллий и их соединения, взаимодействуют с SH-группами аминокислот, образующих белки, а соединения свинца, кадмия, никеля, меди и кобальта — с карбоксильными группами [6].

#### УЧАСТИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В РАЗВИТИИ АУТОИММУННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА И ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Под аутоиммунитетом принято понимать способность организма вырабатывать аутоантитела к собственным антигенам. Стоит отметить, что аутоантитела к различным антигенам, включая ДНК, компоненты цитоскелета, миелин, цитохром С, коллаген, трансферрин, компоненты клеток сердца, почек, эритроцитов, фибробластов и другие, в малых количествах присутствуют в сыворотке крови практически всех здоровых людей. Титр этих антител может повышаться с возрастом, на фоне различных инфекционных заболеваний и лекарственной терапии, однако никаких видимых патологических последствий от присутствия аутоантител для организма не наблюдается [12]. Однако, если аутоиммунный процесс по отношению к собственным антигенам приводит к поражению клеток, тканей и целых органов, развивается аутоиммунное заболевание [12].

Аутоиммунные болезни принято подразделять на органоспецифические и органонеспецифические (системные). При органоспецифических заболеваниях в организме начинают вырабатываться антитела к аутоантигенам определенных органов. Так, например, при аутоиммунном тиреоидите появляются аутоантитела, обладающие абсолютной специфичностью к белкам щитовидной железы. При некоторых почечных заболеваниях вырабатываются аутоантитела к базальной мембране почечных клубочков. В случае системных аутоиммунных заболеваний аутоантитела направлены против молекулярных и структурных компонентов клеток, образующих разные ткани и органы. В качестве мишеней при таких заболеваниях выступают ДНК, рибонуклеопротеиды (РНП), а также ядерные и цитоплазматические белки. Антитела к одному или нескольким перечисленным антигенам присутствуют у больных системной красной волчанкой (СКВ) (антитела к нативной ДНК, гистонам), ревматоидным артритом (РА) (антитела к ядерным РНП), системной склеродермией (ССД) (антитела

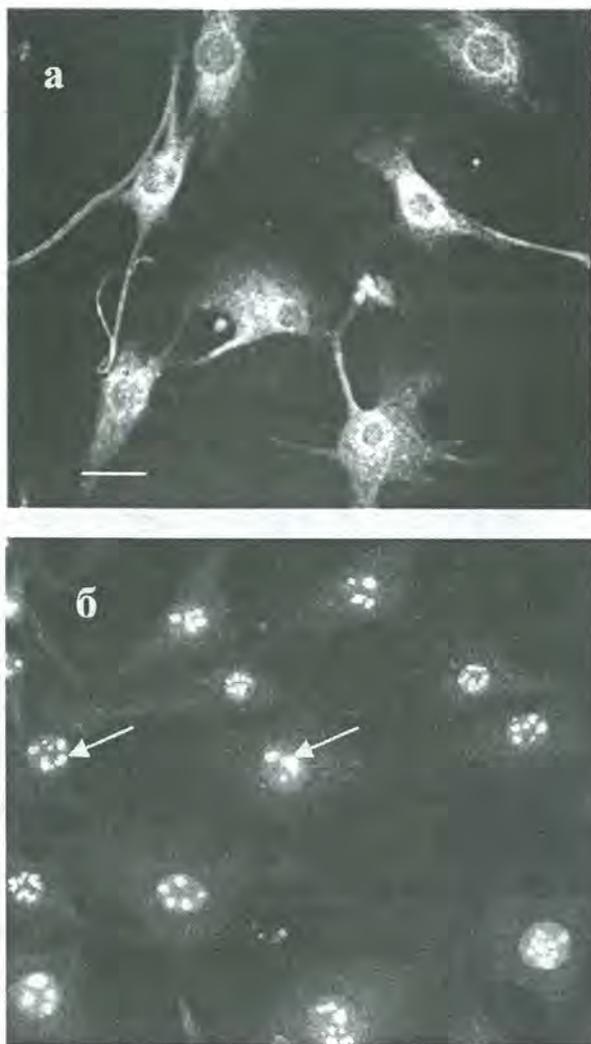
к негистоновым протеинам, ядерным РНП) и другими патологиями.

Возможность влияния тяжелых металлов на возникновение и течение аутоиммунных заболеваний подтверждается тем фактом, что в крови людей, подвергавшихся длительному воздействию ртути, были обнаружены антитела к внутриядерным и внутриядрышковым антигенам [86, 87]. Появление аутоантител к белку ядрышка фибрилларину (см. ниже) у больных ССД коррелирует с повышенным содержанием ртути в моче [16], что позволяет рассматривать данный металл в качестве возможного индуктора аутоиммунного процесса, сопровождающегося появлением аутоантител к фибрилларину [11]. Согласно наблюдениям зарубежных авторов, хроническая подверженность воздействию тяжелых металлов на производстве сопровождается появлением аутоантител к нуклеарным и другим антигенам (часто в высоком титре) [70]. В работе сделан вывод о том, что регулярные контакты с ртутью повышают риск появления аутоантител к нативной ДНК, фибрилларину и нейропептидам, а со свинцом и кадмием — к нуклеопротеинам, нейропептидам и ламинину [70]. Интересен тот факт, что великие художники, использовавшие в своих картинах особенно яркие и чистые краски, в состав которых входили такие тяжелые металлы, как ртуть, кадмий, мышьяк и свинец, страдали от аутоиммунных заболеваний. Так, П. Рубенс, О. Ренуар и Р. Дафи болели РА, а П. Кли — ССД [73].

Изучение роли тяжелых металлов в развитии аутоиммунитета было в значительной степени стимулировано разработкой лабораторных моделей, позволяющих воспроизводить основные признаки аутоиммунных заболеваний человека на животных, подвергавшихся регулярным воздействиям тяжелых металлов. В литературе имеются сведения о способности соединений свинца и кадмия индуцировать аутоиммунный процесс или усилить спонтанный аутоиммунный ответ у лабораторных животных генетически чувствительных линий — мышей и крыс [44, 62, 71]. Однако наиболее хорошо изученной в этом отношении является ртуть. Это связано с тем, что регулярные введения субтоксичных доз как органических ( $\text{CH}_3\text{HgCl}$ ) [37, 41, 50], так и неорганических ( $\text{HgCl}_2$ ) соединений ртути [13, 40, 69, 78] чувствительным животным приводят к образованию антител лишь к одному антигену — белку ядрышка фибрилларину (рис. 1).

Фибрилларин (34-36 кДа, рI 8.5; 321 а.о.) — один из наиболее хорошо изученных белков ядрышка млекопитающих и человека. Он относится к жизненно необходимым и наиболее консервативным белкам эукариот, так что степень его гомологии у человека и мыши составляет более 94 %, а у человека и пекарских дрожжей — более 70 % [91]. Фибрилларин — обязательный белковый компонент U3, U8 и U13 малых ядрышковых рибонуклеопроте-

Рисунок 1



Пример иммуноцитохимического окрашивания клеток НИН/3Т3 сывороткой мыши линии SJL до (а) и через три недели после начала регулярных инъекций  $1 \mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  (б). Фибрилларин (стрелки) выявляется в зоне ядрышек в виде гранул разного размера (б). Масштабная линия –  $20 \mu\text{M}$ .

идов (мякРНП), основной функцией которых является участие в созревании первичных транскриптов рибосомной РНК (рРНК) и биогенезе рибосом. На электронно-микроскопическом уровне фибрилларин выявляется в фибриллярной зоне ядрышка, что и послужило обоснованием для названия белка. На светооптическом уровне он проявляется в виде крупных дискретных гранул, которые соответствуют местам синтеза (рРНК) в ядрышках и пространственно ассоциированы с РНК полимеразой I (рис. 1). Другой иммуноцитохимической особенностью фибрилларина является его прочная связь с поверхностью хромосом в митозе, хотя механизмы и биологическое значение этого взаимодействия до сих пор остаются не известными [7, 8]. Фибрилларин является одной из мишеней аутоантител при системных аутоиммунных заболеваниях человека [42, 55, 90, 92, 96]. Принято считать, что аутоантитела к фибрилларину являются характерным признаком

диффузной формы прогрессирующей ССД. У таких больных аутоантитела к фибрилларину возникают примерно в 14 % случаев [90, 96]. Однако известна работа, в которой антитела к фибрилларину были описаны также у больных СКВ (39%), CREST-синдромом (58%), РА (60%) и синдромом Шегрена (84%) [55]. Эти результаты авторы объяснили большей чувствительностью радиоиммунного метода (РИА), использованного ими для выявления фибрилларина, по сравнению с методами иммунофлуоресценции и иммунопреципитации, классически применяемыми в иммунодиагностике аутоиммунной патологии [55]. Однако в более поздних работах эти данные не подтвердились, что позволяет считать аутоантитела к фибрилларину специфическим признаком прогрессирующей ССД [17, 92]. Существует корреляция между наличием антител к фибрилларину, тяжестью течения и повышенной вероятностью смертельного исхода аутоиммунной болезни. Согласно данным зарубежных авторов, появление антител к фибрилларину сопровождается миозитом, плевритом, перикардитом и поражением почек [23, 42, 92].

Наряду с подверженностью воздействию тяжелых металлов, другим условием возникновения аутоантител к фибрилларину является генетическая предрасположенность индивидов. Известны данные о том, аутоантитела к этому белку с большей частотой встречаются у пациентов афро-карибской и азиатской популяций, чем у европеоидной расы [90]. Образование антител к фибрилларину у больных ССД ассоциировано с наличием некоторых аллелей генотипа HLA-DQB1 [17, 89].

Так же как и у людей, генетическая предрасположенность является обязательным условием появления аутоантител к фибрилларину у лабораторных животных – мышей и крыс. При работе с мышами для индукции аутоантител к фибрилларину обычно используют низкие – порядка  $1 \mu\text{M}$  – концентрации  $\text{HgCl}_2$  (хлорид ртути, или сулема), которые принято называть субтоксичными, поскольку они не вызывают острого отравления ртутью. Сулему давали животным одним из трех способов – с питьевой водой (1-8 мг/л воды) [69], путем регулярных подкожных инъекций (1,6 мг/кг) [4, 18, 40] или в виде аэрозоля (поглощаемая доза составляет ~ 170 мкг/кг ртути в неделю) [94]. Вне зависимости от способа введения сулемы аутоантитела к фибрилларину появляются у животных через 2-3 недели после начала воздействия токсина, а их титр достигает максимальных значений примерно через месяц [4, 18, 69, 94]. Для выявления антител к фибрилларину наиболее часто используют методы непрямой иммуноцитохимии, окрашивая сыворотками животных препараты клеток человека (HeLa, Нер-2) или мыши (3Т3/НИН). С помощью этих и некоторых других подходов установлено, что наиболее чувствительными к воздействию соединений ртути, вклю-

чая HgCl<sub>2</sub>, оказываются линии мышей, имеющие гаплотип H-2<sup>s</sup>, такие как SJL и A.SW [69]. У мышей с гаплотипом H-2<sup>a</sup>, H-2<sup>f</sup>, H-2<sup>p</sup> аутоантитела к фибрилларину хотя и индуцируются, но титр их оказывается на порядки ниже, чем у мышей с гаплотипом H-2<sup>s</sup> [13, 40]. У мышей с другими гаплотипами антител к фибрилларину в ответ на воздействие соединений ртути не образуется [13, 69].

Некоторые авторы полагают, что интенсивность аутоиммунного ответа к фибрилларину зависит от времени экспозиции и, следовательно, от количества отложившейся в организме животных ртути [69]. Однако другие данные показывают, что титр антител к фибрилларину падает через некоторое

В литературе имеются также указания на способность HgCl<sub>2</sub> и других тяжелых металлов обострять течение аутоиммунных процессов, спонтанно развивающихся у мышей некоторых линий (BXSB, MRL и гибридов первого поколения (NZB x NZW)F1) и сопровождающихся выработкой антител к двуспиральной ДНК, коллагену, кардиолипину или фосфатидилэтаноламину [14, 44, 74, 62, 76]. При исследовании таких животных обнаружено, что хроническое (в течение 30 недель) получение ими кадмия с питьевой водой приводит к более раннему появлению признаков спонтанного аутоиммунного процесса по сравнению с животными, потреблявшими чистую воду [62].

Таблица 1

**ЭФФЕКТЫ НЕКОТОРЫХ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ, ПРОЯВЛЯЕМЫЕ НА КЛЕТОЧНОМ И ОРГАНИЗМЕННОМ УРОВНЯХ У АУТОИММУННЫХ БОЛЬНЫХ И ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ**

Металл (в скобках указана валентность в составе активных соединений)	Основные эффекты, наблюдаемые на клеточном уровне <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>
Hg(II), Cd(II), Pb(II), Pt(II)	Миграция фибрилларина из ядрышка в нуклеоплазму [28]
Hg(II), Cd(II), Pb(II), Pt(II)	Конформационные изменения ДНК [88, 99]
Pt(II)	Ингибирование транскрипции рибосомных генов [48, 53]
Pt(II)	Ингибирование транскрипции структурных генов [54]
Pt(II)	Нарушение сплайсинга пре – мРНК [83]
Металл	Аутоиммунные патологии, наблюдаемые у мышей при хроническом воздействии тяжелых металлов
Hg(II), Ag(I)	Индукция аутоантител к фибрилларину у мышей с гаплотипом H2-s, сопровождающаяся активацией В-лимфоцитов и образованием иммунных комплексов в почках [13, 40, 46, 69, 78]
Hg(II), Cd(II), Pb(II)	Раннее развитие спонтанного аутоиммунного заболевания, характеризующегося появлением аутоантител к ДНК и гломерулонефритом у мышей (NZB x NZW)F1 и NZM [14,44,62,74]
Pt(II, IV)	Индукция аутоантител к нуклеоплазматическим антигенам, ассоциированным с местами транскрипции рибосомных и структурных генов [26]
Металл	Аутоиммунные патологии, наблюдаемые у людей при хроническом воздействии тяжелых металлов
Hg(II), Cd(II)	Повышенный титр аутоантител к ДНК [22,35,87]
Hg(II)	Повышенный титр аутоантител к белкам ядрышка [87]
Hg(II), Cd(II), Pb(II)	Повышенный титр аутоантител к нейропептидам [32,33,67]

время после их появления (как правило, через 8-10 недель), несмотря на продолжающиеся введения HgCl<sub>2</sub> [4, 47]. Любопытно, что аутоантитела к фибрилларину могут сохраняться в крови животных в течение нескольких месяцев после прекращения воздействия [4, 47].

Аутоиммунный процесс, индуцированный хлоридом ртути у генетически чувствительных линий мышей, наряду с появлением антител к фибрилларину, сопровождается и другими признаками активации иммунной системы – увеличением сыровороточных иммуноглобулинов класса IgG и IgE [13], поликлональной активацией В- и Т-лимфоцитов [51, 52], а также отложением иммунных комплексов в клубочках почек [13]. Заметим, что образование иммунных комплексов в почках у людей является одним из признаков поражения тяжелыми металлами [70].

Драгоценные металлы – серебро, золото и платина – также способны индуцировать появление аутоантител у генетически предрасположенных линий животных, хотя аналогичные данные на людях нам не известны. Установлено, что воздействие нитрата серебра на мышей с гаплотипом H-2<sup>s</sup> вызывает образование аутоантител к фибрилларину, т.е. приводит к тем же эффектам, что и воздействие HgCl<sub>2</sub> [46, 50]. Платина (II, IV) индуцирует появление аутоантител к нуклеоплазменным антигенам, ассоциированным с сайтами транскрипции [26]. Цитопатические эффекты некоторых тяжелых металлов на клеточном и организменном уровне представлены в табл. 1.

Сводя воедино описанное выше, следует отметить, что существующие лабораторные модели представляют собой уникальные экспериментальные системы для исследования механизмов дейс-

твия тяжелых металлов в качестве индукторов системных аутоиммунных заболеваний у человека

### ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ АУТОИММУНИТЕТА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Конкретные молекулярные механизмы, приводящие к развитию или усилению аутоиммунного процесса под влиянием тяжелых металлов у людей и лабораторных животных, остаются неизвестными, несмотря на то, что этой проблеме посвящено значительное количество публикаций.

Согласно существующим представлениям, основной цитопатический механизм действия ртути — её связывание с внутриядерными пептидами, следствием чего является нарушение их функций и представление иммунной системе измененного белка. В пользу этого заключения говорит тот факт, что *in vitro* и *in vivo* ртуть (II) активно взаимодействует с тиоловыми (SH-) группами, которые присутствуют в составе аминокислотных остатков многих белков. Показано, что в клетках печени ртуть связывается с SH-группами в остатках глутатиона и металлотеонеина [5].

Мишенью ртути является и белок ядрышка фибрилларин: в молекуле фибрилларина человека присутствуют два остатка цистеина. Полагают, что ртуть (II), взаимодействуя с SH-группами цистеина, изменяет конформацию фибрилларина и (или) вызывает его протеолиз. Измененный фибрилларин процессируется антигенпредставляющими клетками (АПК) — макрофагами и дендритными клетками — и в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) представляется клеткам иммунной системы (рис. 2). Клетки иммунной системы распознают такой измененный белок как чужеродный и начинают вырабатывать антитела, которые узнают не только модифицированный, но и нативный фибрилларин.

В пользу этой гипотезы говорят данные о том, что введение веществ, содержащих тиоловые группы, например унитиола (2,3-димеркапто-1-пропансульфоновой кислоты) и ДМЯК (2,3-димеркаптоянтарной кислоты), мышам чувствительной линии SJL препятствовало возникновению аутоантител к фибрилларину и образованию иммунных комплексов в почках под воздействием  $HgCl_2$  [43]. При исследовании клонов  $CD4^+$  Т-лимфоцитов (Т-хелперов), выделенных из мыши после введения  $HgCl_2$ , обнаружено, что один из этих клонов реагировал исключительно с фибрилларинном, предварительно обработанным ртутью. Остальные клоны реагировали с нативным фибрилларинном [59]. Возможно также, что Т-клеточный иммунный ответ сначала индуцируется модифицированным фибрилларинном, а затем происходит активация Т-лимфоцитов, узнающих нативные эпитопы белка [60]. В пользу этого говорят данные о том, что

Рисунок 2

### СХЕМА, ИЛЛЮСТРИРУЮЩАЯ ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ПРЕЗЕНТАЦИИ АУТОАНТИГЕНА (ФИБРИЛЛАРИНА), ИЗМЕНЕННОГО РТУТЬЮ (HG), АНТИГЕН-ПРЕДСТАВЛЯЮЩИМИ КЛЕТКАМИ (МАКРОФАГАМИ ИЛИ ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ).



МНС — главный комплекс гистосовместимости.

Т-клетки, изолированные из мыши, получавшей ртуть в течение одной недели, преимущественно реагировали с комплексом фибрилларин-ртуть, но не с нативным фибрилларинном. Напротив, Т-клетки, выделенные из мыши, получавшей  $HgCl_2$  в течение восьми недель, реагировали как со связанным с ртутью, так и с нативным фибрилларинном [60].

Одним из механизмов формирования модифицированного фибрилларина под действием  $HgCl_2$ , по-видимому, является его расщепление протеолитическими ферментами, присутствующими в ядерных протеосомах. Эта точка зрения подтверждается наблюдениями о миграции фибрилларина из ядрышка в нуклеоплазму и его ко-локализации с протеосомами при инкубации клеток человека Нер-2 с субтоксичными дозами ( $1 \mu M$ )  $HgCl_2$  *in vitro* [27, 28]. Примечательно, что в тех же условиях топология других белков ядрышка, подобно фибрилларину участвующих в процессинге рРНК, — нуклеолина и В23, не изменяется [27, 28]. Перераспределение фибрилларина и его протеолиз сопровождается прекращением транскрипции рибосомных генов и приводит к гибели клеток путем апоптоза. Существенно, что сходные изменения в локализации фибрилларина проявляются также в спленоцитах, выделенных из мышей, которые развили аутоиммунный ответ к фибрилларину под действием  $HgCl_2$  [27]. Ионы других тяжелых металлов — свинца, кадмия, золота и платины — вызывают перераспределение фибрилларина при применении их в значительно более высоких дозах ( $100-500 \mu M$ ) [28].

Необходимо, однако, отметить, что, допуская способность ртути связываться с фибрилларинном, некоторые авторы ставят под сомнение особую роль цистеинов, присутствующих в фибрилларине человека, в этом взаимодействии [75]. Эти сомнения основаны на наблюдениях, продемонстриро-

вавших, что инкубация с  $HgCl_2$  макрофагов мыши линии J774A.1, продуцирующих генетически модифицированный и лишенный остатков цистеина фибрилларин, приводит к характерному протеолизу фибрилларина. Последующая иммунизация «чувствительных» животных фрагментом фибрилларина с подвижностью 19 кДа вызывает образование аутоантител к белку [75]. Авторы работы заключили, что ртуть (II) действительно индуцирует расщепление фибрилларина, однако наличие цистеинов не является необходимым условием этого процесса.

По-видимому, не только ртуть, но и другие тяжелые металлы могут индуцировать расщепление антигенов ядерными протеосомами. Так, у мышей появление аутоантител к нуклеарному антигену в ответ на введение платины (IV) сопровождалось изменениями в расположении этого антигена в антиген-представляющих дендритных клетках [26]. При исследовании дендритных клеток людей, страдающих ССД и вырабатывающих аутоантитела к топоизомеразе I (ядерный белок, участвующий в транскрипции ДНК), обнаружено, что топоизомераза I также ко-локализуется с протеосомами [25]. Такого перераспределения не обнаружено в дендритных клетках больных ССД, не имеющих аутоантител к топоизомеразе I [25]. Таким образом, суть современной гипотезы развития аутоиммунного процесса под действием тяжелых металлов предполагает связывание металла с антигеном, что индуцирует протеолиз и (или) конформационные изменения антигена и представление измененного пептида в комплексе с молекулами МНС I и II классов клеткам иммунной системы [29].

Однако эта гипотеза не объясняет факта генетической предрасположенности организмов к развитию аутоиммунного процесса под действием тяжелых металлов, в частности ртути, о которой упоминалось выше. Как известно, при иммунном ответе активация Т-лимфоцитов происходит через взаимодействие их антиген-распознающего рецептора со специфичным антигеном в комплексе с молекулами МНС на поверхности антиген-представляющих клеток (АПК). Ионы металлов, не будучи антигенами сами по себе, являются типичными гаптенами и потому могут связываться с антигенами, находящимися в комплексе с молекулами МНС, что должно привести к конформационным изменениям антигена [21]. Возможно, повышенная чувствительность животных с гаплотипом H-2<sup>s</sup> к хлориду ртути обусловлена тем, что только молекулы МНС II класса I-A<sup>s</sup> способны презентировать эпитопы модифицированного фибрилларина. Действительно, на потомках первого поколения линий мышей с разными гаплотипами – H-2<sup>s</sup> (чувствительным) и H-2<sup>b</sup> (нечувствительным) – показано, что экспрессия молекул I-A<sup>b</sup> приводит к возникновению устойчивости к воздействию  $HgCl_2$ , и аутоантитела к фибрилларину у таких гибридов

не образуются [39]. Для активации аутореактивных Т-клеток кроме специфичного связывания их рецепторов с комплексом МНС–антиген требуются ещё неантигенспецифичные стимулы, одними из которых являются молекулы В7-1 и В7-2 на АПК. Нарушение связи между АПК и Т-лимфоцитами, за счет блокады этих молекул, приводит к тому, что у генетически чувствительной линии мышей не происходит образования антител к фибрилларину в ответ на воздействие  $HgCl_2$  [19]. На способность образовывать аутоантитела к фибрилларину влияют также гены, расположенные вне локуса МНС. Одним из них является локус *Hmr1* на 1 хромосоме в геноме мышей линии DBA/2 (H-2<sup>d</sup>), которая резистентна к индукции аутоантител к фибрилларину. При внесении этого локуса в геном мышей, чувствительных к воздействию хлорида ртути (линия SJL), путем скрещивания животных обнаружено, что гибриды первого и второго поколения (DBA/2хSJL) практически теряют способность вырабатывать аутоантитела к фибрилларину [58].

Принципиально иная гипотеза, объясняющая возникновение аутоиммунного ответа под действием тяжелых металлов, основана на способности металлов нарушать иммунологическую толерантность, которая в нормальном организме контролирует состояние аутореактивности. В процессе онтогенеза в герминативных лимфоидных органах – тимусе и костном мозге – происходит уничтожение клонов лимфоцитов, несущих высокоавидные рецепторы к собственным антигенам, в результате чего возникает так называемая центральная толерантность. Аутореактивные клетки, которым удалось избежать такой клональной селекции, находятся под контролем различных регуляторных механизмов, обеспечивающих периферическую толерантность (анергия, апоптоз, супрессия регуляторными лимфоцитами и др.) [79]. Нарушение этих механизмов может привести к изменениям в процессах иммунологической толерантности и, как следствие, к развитию (аутоиммунитета). Так, на культуре человеческих лимфоцитов было показано, что  $HgCl_2$  в низкой концентрации (10  $\mu M$ ) нарушает образование сигнального комплекса DISC, необходимого для запуска апоптоза, что позволяет аутореактивным лимфоцитам избежать нормальной регуляции [66]. Эти данные подтвердились и в дальнейших исследованиях [65,97]. Тем не менее одним из основных эффектов воздействия тяжелых металлов на организм все же принято считать их цито- и иммунотоксичность [70]. С другой стороны, существует большое количество работ, доказывающих, что тяжелые металлы, в частности ртуть, кадмий и мышьяк, усиливают апоптоз лимфатических клеток *in vitro* [30, 36, 38, 84, 85].

Обобщая известные на настоящий момент данные, отметим, что изучение способности тяжелых металлов к индукции и усилению аутоиммунного

процесса является обширным полем деятельности для исследователей. Представляется также перспективным использование лабораторных животных в качестве модели для изучения механизмов возникновения аутоиммунного ответа и развития аутоиммунных нарушений, характерных для больных ауто-

иммунными заболеваниями. В нашей стране для этих целей могут быть использованы мыши линии SJL, которые под влиянием субтоксичных доз  $HgCl_2$  развивают отчетливый аутоиммунный ответ к белку ядрышка фибрилларину – мишени аутоантител при многих аутоиммунных болезнях [4].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Будников Г.К. Тяжелые металлы в экологическом мониторинге водных систем. СОЖ, 1998, 5, 23 – 29.
2. Галактионов В.Г. Иммунология. М., Нива России, 2000, 408.
3. Касохов А.Б. Нарушение иммунобиологической реактивности в условиях загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами. Росс. вест. перинатол. педиатрии, 1999, 5.
4. Красильщикова М.С., Аблаева Ю.В., Сперанский А.И. и др. Индукция аутоиммунного процесса с помощью регулярных инъекций хлорида ртути мышам линии SJL. Докл. Акад. наук, 2006, 409, 1, 129-132.
5. Кулинский В.И. Обезвреживание ксенобиотиков. Соровский образоват. журн., 1999, 1, 8 -12.
6. Куценко С.А. Основы токсикологии. Санкт - Петербург, 2002.
7. Левитский С.А., Мухарьямова К.Ш., Вейко В.П. Выявление сигнальных последовательностей в молекуле фибрилларина, определяющих его специфическую локализацию в ядрышках клеток HeLa. Молекулярная биология, 2004, 38, 1 - 10.
8. Мухарьямова К.Ш., Дудник О.А., Сперанский А.И. и др. Сравнительная локализация основных белков ядрышка фибрилларина и В-23 в делящихся клетках млекопитающих. Биологические мембраны, 1998, 15, 657 – 669.
9. Реймерс Н.Ф. Азбука природы. Микрэнциклопедия биосферы. Моск., “Знание”, 1980.
10. Сборник санитарно-гигиенических нормативов и методов контроля вредных веществ в объектах окружающей среды. Моск., 1991.
11. Сперанский А.И., Иванова С.М. Аутоиммунные болезни (клинические и теоретические аспекты). Аллергол. иммунол., 2002, 3, 10 - 23.
12. Ярилин А.А. Основы иммунологии. М., Медицина, 1999, 608.
13. Abedi-Valugerdi M., Moller G. Contribution of H-2 and non-H-2 genes in the control of mercury-induced autoimmunity. Int. Immunol., 2000, 12, 10, 1425 - 1430.
14. Abedi-Valugerdi M., Hu H., Moller G. Mercury-induced renal immune complex deposits in young (NZB x NZW) F1 mice: characterization of antibodies/autoantibodies. Clin. Exp. Immunol., 1997, 110, 1, 86 - 91.
15. Abedi-Valugerdi M., Hu H., Moller G. Mercury-induced anti-nucleolar autoantibodies can transgress the membrane of living cells in vivo and in vitro. Int. Immunol., 1999, 11, 4, 605 - 615.
16. Arnett F., Fritzler M., Ahn C. et al. Urinary mercury levels in patients with autoantibodies to U3-RNP (fibrillarin). J. Rheumatol., 2000, 27, 2, 405 - 410.
17. Arnett F., Reveille J., Goldstein R. et al. Autoantibodies to fibrillarin in systemic sclerosis (scleroderma). An immunogenetic, serologic, and clinical analysis. Arthr. Rheum., 1996, 39, 7, 1151-1160.
18. Bagenstose L., Salgame P., Monestier M. IL-12 down-regulates autoantibody production in mercury-induced autoimmunity. J. Immunol., 1998, 160, 4, 1612 - 1917.
19. Bagenstose L., Class R., Salgame P. et al. B7-1 and B7-2 co-stimulatory molecules are required for mercury-induced autoimmunity. Clin. Exp. Immunol., 2002, 127, 1, m - 19.
20. Bigazzi P. Autoimmunity and heavy metals. Lupus, 1994, 3, 6, 449 - 453.
21. Budinger L., Hertl M. Immunologic mechanisms in hypersensitivity reactions to metal ions: an overview. Allergy, 2000, 55, 2, 108 - 115.
22. Cardenas A., Roels H., Bernard A. et al. Markers of early renal changes induced by industrial pollutants. I. Application to workers exposed to mercury vapour. Br. J. Ind. Med., 1993, 50, 1, 17-27.
23. Cepeda E., Reveille J. Autoantibodies in systemic sclerosis and fibrosing syndromes: clinical indications and relevance. Curr. Opin. Rheumatol., 2004, 16, 6, 723 - 732.
24. Charpentier B., Moullot P., Faux N. et al. T lymphocytes functions in mercuric chloride-induced membranous glomerulonephritis in man. Evidence for a defect of presentation of the histocompatibility class II molecules at the cell surface. Nephrologie, 1981, 2, 4, 153 - 157.
25. Chen M., Dittmann A., Kuhn A. et al. Recruitment of topoisomerase I (Scl-70) to nucleoplasmic proteasomes in response to xenobiotics suggests a role for altered antigen processing in scleroderma. Arthr. Rheum., 2005, 52, 3, 877 - 884.
26. Chen M., Hemmerich P., von Mikecz A. Platinum-induced autoantibodies target nucleoplasmic antigens related to active transcription. Immunobiology, 2002, 206, 5, 474 - 483.

27. Chen M., Rockel T., Steinweger G. et al. Subcellular recruitment of fibrillarin to nucleoplasmic proteasomes: implications for processing of a nucleolar autoantigen. *Mol. Biol. Cell*, 2002, 13, 10, 3576 - 3587.
28. Chen M., von Mikecz A. Specific inhibition of rRNA transcription and dynamic relocation of fibrillarin induced by mercury. *Exp. Cell Res.*, 2000, 259, 1, 225 - 238.
29. Chen M., von Mikecz A. Proteasomal processing of nuclear autoantigens in systemic autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, 2005, 4, 3, 117 - 122.
30. de la Fuente H., Portales-Perez D., Baranda L. et al. Effect of arsenic, cadmium and lead on the induction of apoptosis of normal human mononuclear cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 2002, 129, 1, 69 - 77.
31. Edwards C., Cooper C. Early environmental factors and rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.*, 2006, 143, 1, 1-5.
32. El-Gazzar R., Shamy M., Moneim I. et al. Occupational exposure to mercury results in serum autoantibodies to neurotypic and gliotypic proteins. *Toxicologist*, 1994, 14, 291.
33. Evans H., Taioli E., Toniolo P. et al. Serum autoantibody to nervous system proteins: Isotypes in workers exposed to cadmium and nickel. *Toxicologist*, 1994, 14, 291.
34. Fairweather D., Rose N. Women and autoimmune diseases. *Emerg. Infect. Dis.*, 2004, 10, 11, 2005 - 2011.
35. Frenkel K., Karkoszka J., Cohen B. et al. Occupational exposures to Cd, Ni, and Cr modulate titers of autoantibodies to oxidized DNA base autoantibodies. *Environ. Health. Perspect.*, 1994, 102, 3, 221 - 225.
36. Goering P., Thomas D., Rojko J. et al. Mercuric chloride-induced apoptosis is dependent on protein synthesis. *Toxicol. Lett.*, 1999, 105, 3, 183 - 195.
37. Haggqvist B., Havarinasab S., Bjorn E. et al. The immunosuppressive effect of methylmercury does not preclude development of autoimmunity in genetically susceptible mice. *Toxicology*, 2005, 208, 1, 149 - 164.
38. Hamada T., Tanimoto A., Sasaguri Y. Apoptosis induced by cadmium. *Apoptosis*, 1997, 2, 4, 359 - 367.
39. Hanley G., Schiffenbauer J., Sobel E. Resistance to HgCl<sub>2</sub>-induced autoimmunity in haplotype-heterozygous mice is an intrinsic property of B cells. *J. Immunol.*, 1998, 161, 4, 1778 - 1785.
40. Hansson M., Abedi-Valugerdi M. Xenobiotic metal-induced autoimmunity: mercury and silver differentially induce antinucleolar autoantibody production in susceptible H-2s, H-2q and H-2f mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 2003, 131, 3, 405 - 414.
41. Havarinasab S., Hultman P. Organic mercury compounds and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, 2005, 4, 5, 270 - 275.
42. Ho K., Reveille J. The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthr. Res. Ther.*, 2003, 5, 2, 80 - 93.
43. Hu H., Moller G., Abedi-Valugerdi M. Thiol compounds inhibit mercury-induced immunological and immunopathological alterations in susceptible mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 1997, 107, 1, 68 - 75.
44. Hudson C., Cao L., Kasten-Jolly J. et al. Susceptibility of lupus-prone NZM mouse strains to lead exacerbation of systemic lupus erythematosus symptoms. *J. Toxicol. Environ. Health*, 2003, 66, 10, 895 - 918.
45. Hultman P., Hansson-Georgiadis H. Methyl mercury-induced autoimmunity in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1999, 154, 3, 203 - 211.
46. Hultman P., Ganowski K., Turley S. et al. Genetic susceptibility to silver-induced anti-fibrillarin autoantibodies in mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1995, 77, 3, 291 - 297.
47. Hultman P., Turley S., Enestrom S. et al. Murine genotype influences the specificity, magnitude and persistence of murine mercury-induced autoimmunity. *J. Autoimmun.*, 1996, 9, 2, 139 - 149.
48. Horky M., Wurzer G., Kotala V. et al. Segregation of nucleolar components coincides with caspase-3 activation in cisplatin-treated HeLa cells. *J. Cell Sci.*, 2001, 114, 663 - 670.
49. Jarup L. Hazards of heavy metal contamination. *Br. Med. Bull.*, 2003, 68, 167 - 182.
50. Johansson U., Hansson-Georgiadis H., Hultman P. Murine silver-induced autoimmunity: silver shares induction of antinucleolar antibodies with mercury, but causes less activation of the immune system. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1997, 113, 4, 432 - 443.
51. Johansson U., Hansson-Georgiadis H., Hultman P. The genotype determines the B cell response in mercury-treated mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1998, 116, 4, 295 - 305.
52. Johansson U., Sander B., Hultman P. Effects of the murine genotype on T cell activation and cytokine production in murine mercury-induced autoimmunity. *J. Autoimmun.*, 1997, 10, 4, 347 - 355.
53. Jordan P., Carmo-Fonseca M. Cisplatin inhibits synthesis of ribosomal RNA in vivo. *Nucle. Acids Res.*, 1998, 26(12), 2831 - 2836.
54. Jung Y., Lippard S. RNA polymerase II blockage by cisplatin-damaged DNA. Stability and polyubiquitylation of stalled polymerase. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281(3), 1361 - 1370.
55. Kasturi K., Hatakeyama A., Spiera H. et al. Antifibrillarin autoantibodies present in systemic sclerosis and other connective tissue diseases interact with similar epitopes. *J. Exp. Med.*, 1995, 181, 3, 1027 - 1036.
56. Kimber I., Dearman R. Immunologic basis for autoimmunity and the potential influences of xenobiotics. *Toxicol. Lett.*, 2002, 127, 1-3, 77 - 81.

57. Kita H., He X., Gershwin M. Autoimmunity and environmental factors in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Ann. Med.*, 2004, 36, 1, 72 - 80.
58. Kono D., Park M., Szydlak A. et al. Resistance to xenobiotic-induced autoimmunity maps to chromosome 1. *J. Immunol.*, 2001, 167, 4, 2396 - 2403.
59. Kubicka-Muranyi M., Griem P., Lubben B. et al. Mercuric-chloride-induced autoimmunity in mice involves up-regulated presentation by spleen cells of altered and unaltered nucleolar self antigen. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1995, 108, 1, 1 - 10.
60. Kubicka-Muranyi M., Kremer J., Rottmann N. et al. Murine systemic autoimmune disease induced by mercuric chloride: T helper cells reacting to self proteins. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1996, 109, 1, 11 - 20.
61. Lanzavecchia A. How can cryptic epitopes trigger autoimmunity? *J. Exp. Med.*, 1995, 181, 6, 1945 - 1948.
62. Leffel E., Wolf C., Poklis A. et al. Drinking water exposure to cadmium, an environmental contaminant, results in the exacerbation of autoimmune disease in the murine model. *Toxicology*, 2003, 188, 2-3, 233 - 250.
63. Lewis E., Schwartz M. Pathology of lupus nephritis. *Lupus*, 2005, 14, 1, 31 - 38.
64. Long S., Van de Water J., Gershwin M. Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis: the role of xenobiotics. *Autoimmun. Rev.*, 2002, 1, 1-2, 37 - 42.
65. McCabe M., Eckles K., Langdon M. et al. Attenuation of CD95-induced apoptosis by inorganic mercury: caspase-3 is not a direct target of low levels of Hg2+. *Toxicol. Lett.*, 2005, 155, 1, 161 - 170.
66. McCabe M., Whitekus M., Hyun J. et al. Inorganic mercury attenuates CD95-mediated apoptosis by interfering with formation of the death inducing signaling complex. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2003, 190, 2, 146 - 156.
67. Moneim I., Shamy M., El-Gazzar R. et al. Autoantibodies to neurofilaments (NF), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and myelin basic protein (MBP) in workers exposed to lead. *Toxicologist*, 1994, 14, 291.
68. Moszczynski P. Immunological disorders in men exposed to metallic mercury vapour. A review. *Cent. Eur. J. Public Health*, 1999, 7, 1, 10 - 14.
69. Nielsen J., Hultman P. Mercury-induced autoimmunity in mice. *Environ. Health Perspect.*, 2002, 110, 15, 877 - 881.
70. Ohsawa M. Biomarkers for responses to heavy metals. *Cancer Causes Control*, 1997, 8, 3, 514 - 517.
71. Ohsawa M., Takahashi K., Otsuka F. Induction of anti-nuclear antibodies in mice orally exposed to cadmium at low concentrations. *Clin. Exp. Immunol.*, 1988, 73, 1, 98 - 102.
72. Pathan E., Joshi V. Rheumatoid arthritis and the kidney. *J. Assoc. Physicians India*, 2004, 52, 488 - 494.
73. Pedersen L., Permin H. Rheumatic disease, heavy-metal pigments, and the Great Masters. *Lancet*, 1988, 1, 8597, 1267 - 1269.
74. Pollard K., Pearson D., Hultman P. et al. Lupus-prone mice as models to study xenobiotic-induced acceleration of systemic autoimmunity. *Environ. Health Perspect.*, 1999, 107, 5, 729 - 735.
75. Pollard K., Pearson D., Bluthner M. et al. Proteolytic cleavage of a self-antigen following xenobiotic-induced cell death produces a fragment with novel immunogenic properties. *J. Immunol.*, 2000, 165, 4, 2263 - 2270.
76. Pollard K., Pearson D., Hultman P. et al. Xenobiotic acceleration of idiopathic systemic autoimmunity in lupus-prone b6sbmice. *Environ. Health Perspect.*, 2001, 109, 1, 27 - 33.
77. Powell J., Van de Water J., Gershwin M. Evidence for the role of environmental agents in the initiation or progression of autoimmune conditions. *Environ. Health Perspect.*, 1999, 107, 5, 667 - 672.
78. Reuter R., Tessars G., Vohr H. et al. Mercuric chloride induces autoantibodies against U3 small nuclear ribonucleoprotein in susceptible mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1989, 86, 1, 237 - 241.
79. Ring G., Lakkis F. Breakdown of self-tolerance and the pathogenesis of autoimmunity. *Semin. Nephrol.*, 1999, 19, 1, 25 - 33.
80. Rose N. Mechanisms of autoimmunity. *Semin. Liver Dis.*, 2002, 22, 4, 387 - 394.
81. Rowley B., Monestier M. Mechanisms of heavy metal-induced autoimmunity. *Mol. Immunol.*, 2005, 42, 7, 833 - 838.
82. Sarzi-Puttini P., Atzeni F., Iaccarino L. et al. Environment and systemic lupus erythematosus: an overview. *Autoimmunity*, 2005, 38, 7, 465 - 472.
83. Schmittgen T., Ju J., Danenberg K. et al. Inhibition of pre-mRNA splicing by cisplatin and platinum analogs. *Int. J. Oncol.*, 2003, 23, 3, 785 - 789.
84. Shen X., Lee K., Konig R. Effects of heavy metal ions on resting and antigen-activated CD4(+) T cells. *Toxicology*, 2001, 169, 1, 67 - 80.
85. Shenker B., Pankoski L., Zekavat A. et al. Mercury-induced apoptosis in human lymphocytes: caspase activation is linked to redox status. *Antioxid. Redox. Signal*, 2002, 4, 3, 379 - 389.
86. Silbergeld E., Silva I., Nyland J. Mercury and autoimmunity: implications for occupational and environmental health. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2005, 207, 2, 282 - 292.
87. Silva I., Nyland J., Gorman A. et al. Mercury exposure, malaria, and serum antinuclear/antinucleolar antibodies in amazon populations in Brazil: a cross-sectional study. *Environ. Health*, 2004, 3, 1, 11.
88. Tabata M., Kumar Sarker A., Nyarko E. Enhanced

- conformational changes in DNA in the presence of mercury(II), cadmium(II) and lead(II) porphyrins. *J. Inorg. Biochem.*, 2003, 94, 1-2, 50 - 58.
89. Tikly M., Rands A., McHugh N. et al. Human leukocyte antigen class II associations with systemic sclerosis in South Africans. *Tissue Antigens*, 2004, 63, 5, 487 - 490.
90. Tormey V., Bunn C., Denton C. et al. Anti-fibrillarin antibodies in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*, 2001, 40, 10, 1157 - 1162.
91. Turley S., Tan E., Pollard K. Molecular cloning and sequence analysis of U3 snoRNA-associated mouse fibrillarin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, 1216, 119 - 122.
92. Van Eenennaam H., Vogelzangs J., Bisschops L. et al. Autoantibodies against small nucleolar ribonucleoprotein complexes and their clinical associations. *Clin. Exp. Immunol.*, 2002, 130, 3, 532 - 540.
93. Wang D., Lippard S. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2005, 4, 4, 307 - 320.
94. Warfvinge K., Hansson H., Hultman P. Systemic autoimmunity due to mercury vapor exposure in genetically susceptible mice: dose-response studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1995, 132, 2, 299 - 309.
95. Waterman S., el-Fawal H., Snyder C. Lead alters the immunogenicity of two neural proteins: a potential mechanism for the progression of lead-induced neurotoxicity. *Environ. Health Perspect.*, 1994, 102, 12, 1052 - 1056.
96. Yang J., Hildebrandt B., Luderschmidt C. et al. Human scleroderma sera contain autoantibodies to protein components specific to the U3 small nucleolar RNP complex. *Arthr. Rheum.*, 2003, 48, 1, 210 - 217.
97. Ziemba S., McCabe M., Rosenspire A. Inorganic mercury dissociates preassembled Fas/CD95 receptor oligomers in T lymphocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2005, 206, 3, 334 - 42.

Поступила 20.10.06