

Ж.В. Антонович

Прогнозирование обострения бронхиальной астмы на основе исследования показателей клеточного иммунитета, апоптоза лимфоцитов периферической крови и концентрации цитокинов интерлейкина-4 и интерферона- γ

Белорусский государственный медицинский университет

Статья посвящена разработке количественных критериев для определения периода бронхиальной астмы и прогнозирования обострения заболевания.

Ключевые слова: бронхиальная астма, прогнозирование, обострение, клеточный иммунитет, апоптоз, цитокины, дискриминантный анализ, регрессионный анализ.

Несмотря на значительные успехи в исследовании проблемы бронхиальной астмы (БА), до сих пор отсутствуют точные количественные диагностические критерии для определения периода БА и прогнозирования обострения заболевания. В настоящее время диагностика обострения и ремиссии БА основывается преимущественно на клинических проявлениях заболевания и данных анамнеза и зачастую носит субъективный характер, так как определенная часть больных БА плохо ощущает выраженность симптомов, и такие больные могут не жаловаться на ухудшение даже при значительном снижении функции легких, что чаще наблюдается у пациентов с угрожающими жизни обострениями БА в анамнезе и более распространено у мужчин [1]. С другой стороны, снижение пиковой скорости выдоха при обострении БА может появляться позже, чем увеличение выраженности симптомов БА [4]. Разработка количественных критериев для определения периода БА и прогнозирования обострения заболевания представляет научный и практический интерес, поскольку обострения БА отражают высокую активность воспалительного процесса в дыхательных путях, прогрессирование воспаления, исходом которого является ремоделирование морфологической структуры бронхов с последующим развитием хронической дыхательной недостаточности, а целью лечения БА является достижение ремиссии, поддержание контроля над заболеванием и предупреждение обострений.

С учетом вышесказанного, целью настоящего исследования было разработать количественные критерии для определения периода БА и прогнозирования обострения заболевания.

Материал и методы.

Объектом динамического исследования явились 75 больных БА, обследованные дважды с интервалом 2 месяца (в периоды обострения (до начала лечения в пульмонологическом стационаре) и ремиссии заболевания). Возраст больных БА составил 46 лет (от 31 до 54 лет). По полу больные БА распределились следующим образом: 29% (22) мужчин и 71% (53) женщин. Длительность БА составила 9 лет (от 2 до 16 лет). У 21% (16) больных была диагностирована аллергическая, у 12% (9) – неаллергическая и у 67% (50) – смешанная форма заболевания. Легкое течение БА наблюдалось у 25% (19), среднетяжелое – у 39% (29), тяжелое – у 36% (27) больных. Группу контроля

составили практически здоровые лица в количестве 34 человека (41% (14) мужчин и 59% (34) женщин). Средний возраст лиц контрольной группы был 43 ± 2 года. Статистически значимых различий между группами больных БА и контрольной по полу и возрасту не было. Также отсутствовали статистически значимые различия между группами больных с обострением и ремиссией БА по приему базисной терапии.

Определение Т-лимфоцитов (CD3+), Т-лимфоцитов-хелперов (CD4+), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+), естественных киллерных клеток (CD16+), естественных киллерных клеток с фенотипом Т-лимфоцитов (CD3+CD16+), активированных клеток (CD25+), естественных регуляторных Т-клеток (CD4+CD25hi) проводилось в периферической крови на проточном цитофлюориметре FACScan (Becton Dickinson, США) с моноклональными антителами фирмы Beckman Coulter (США) [2].

Для исследования апоптоза лимфоцитов периферической крови (Лф) использовали набор Annexin V Detection Kit фирмы «Beckman Coulter» (США), включающий аннексин, конъюгированный с флюорохромом (Annexin V-FITC), пропидиум йодид (PI) и буфер для окрашивания. Апоптоз лимфоцитов оценивали на проточном цитофлюориметре FACScan (Becton Dickinson, США). Процентное содержание апоптотических клеток определяли среди свежесыведенных лимфоцитов и в 72-часовых культурах, нестимулированных и стимулированных ФГА (10 мкг/мл) лимфоцитов. При изложении результатов исследования клетки на ранней стадии апоптоза будут обозначаться как Annexin V+PI- (позитивны по Annexin V-FITC, негативны по PI), живые клетки – Annexin V-PI- (негативны по Annexin V-FITC и PI), клетки, находящиеся на поздней стадии апоптоза – Annexin V+PI+, (позитивны по Annexin V-FITC и PI), погибшие клетки – Annexin V-PI+ (негативны по Annexin V-FITC и позитивны по PI) [5].

Концентрации цитокинов интерлейкина-4 (IL-4) и интерферона- γ (IFN- γ) определяли в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа, согласно рекомендации фирмы-производителя с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Россия).

Исследование показателей функции внешнего дыхания (ФВД), проводилось на компьютерном спирографе «МАС-1» (Беларусь).

Статистическую обработку данных выполняли с использованием пакета прикладных программ Statistica 7,0 и Statistica 8,0. Применялись критерии Шапиро-Уилка, Стьюдента, Вилкоксона, Манна-Уитни, Фишера, МакНемара, дискриминантный анализ, логистический регрессионный анализ. За критический уровень статистической значимости принимали вероятность безошибочного прогноза равную 95% ($p < 0,05$) [3].

Результаты и обсуждение

Для выявления количественных признаков, имеющих наиболее существенные межгрупповые различия был проведен сравнительный анализ показателей клеточного иммунитета, апоптоза Лф и концентраций цитокинов

IFN- γ и IL-4, как важных составляющих в процессе воспаления при БА, а также показателей спирометрии.

Показатели ФВД у больных БА в периоды обострения и ремиссии заболевания и в группе практически здоровых лиц представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Показатели функции внешнего дыхания у больных бронхиальной астмой в периоды обострения и ремиссии заболевания и в группе практически здоровых лиц.

Параметр	Группа		
	Больные БА в период обострения (n=75) M \pm m или Me (25% - 75%)	Больные БА в период ремиссии (n=75) M \pm m или Me (25% - 75%)	Группа контроля (n=32) M \pm m или Me (25% - 75%)
ЖЕЛ, %	83 \pm 2 *	89 \pm 2	105 \pm 2
ФЖЕЛ, %	71 \pm 2	83 \pm 2	105 \pm 2
ОФВ ₁ , %	58 \pm 3	71 \pm 3	106 \pm 2
ОФВ ₁ /ЖЕЛ, %	56 (45 - 68)	65 (52 - 76)	80 (77 - 85)
ОФВ ₁ /ФЖЕЛ, %	68 \pm 2 *	71 \pm 2	88 \pm 1
ПОСвыд, %	57 \pm 3	68 \pm 3	94 \pm 3
МОС ₂₅ , %	42 (27 - 61)	56 (36 - 81)	98 (85 - 115)
МОС ₅₀ , %	33 (22 - 51)	46 (27 - 66)	102 (89 - 110)
МОС ₇₅ , %	30 (21 - 46)	39 (24 - 57)	94 (81 - 110)
СОС ₂₅₋₇₅ , %	36 (23 - 55)	46 (27 - 74)	104 (100 - 119)
МВЛ, %	33 (23 - 48) *	40 (27 - 54) **	54 (43 - 65)

Примечания: Во всех сравнениях $p < 0,001$, кроме

1. * - $p < 0,05$ по сравнению с ремиссией БА;
2. ** - $p < 0,01$ по сравнению с группой контроля.

Показатели клеточного иммунитета и концентрации цитокинов IFN- γ и IL-4 у практически здоровых лиц и больных БА в периоды обострения и ремиссии заболевания представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Показатели клеточного иммунитета и концентрации цитокинов IFN- γ и IL-4 у практически здоровых лиц и больных БА в периоды обострения и ремиссии заболевания.

Показатель	Группа		
	Больные БА в период обострения (n=48) M ± m или Me (25% - 75%)	Больные БА в период ремиссии (n=48) M ± m или Me (25% - 75%)	Практически здоровые лица (n=30) M ± m или Me (25% - 75%)
T-лимфоциты CD3 ⁺ , %	66,73 (60,54 - 72,30)	67,99 (64,56 - 71,64)	68,49 (66,14 - 70,77)
T-лимфоциты CD3 ⁺ , кл/мкл	1759,49 * (1215,70 - 2292,28)	1508,73 (1150,65 - 1955,03)	1413,97 (1193,00 - 1659,04)
T-хелперы CD4 ⁺ , %	38,19 (35,37 - 44,33)	39,23 (33,69 - 43,76)	40,08 (36,93 - 41,72)
T-хелперы CD4 ⁺ , кл/мкл	1011,05 * (756,10 - 1354,93)	843,89 (664,02 - 1146,83)	876,74 (676,56 - 960,27)
T-цитотоксические CD8 ⁺ , %	20,41 ± 0,65 *	23,29 ± 0,73	23,19 ± 0,62
T-цитотоксические CD8 ⁺ , кл/мкл	502,59 (360,38 - 767,91)	488,73 (387,69 - 654,73)	480,31 (394,57 - 582,52)
Естественные киллеры CD16 ⁺ , %	13,42 (10,05 - 17,75)	13,97 (9,79 - 18,33)	14,08 (11,35 - 16,93)
Естественные киллеры CD16 ⁺ , кл/мкл	299,21 (201,36 - 495,79)	312,29 (178,12 - 422,56)	286,21 (221,87 - 343,74)
T-клетки с киллерной активностью CD3 ⁺ CD16 ⁺ , %	7,01 (3,47 - 18,35)	7,33 (3,33 - 12,32)	5,06 (3,87 - 8,91)
CD3 ⁺ CD16 ⁺ , кл/мкл	182,61 (73,32 - 382,99)	117,52 (71,10 - 357,06)	109,45 (67,87 - 195,94)
Активированные клетки CD25 ⁺ , %	10,22 *** (4,92 - 13,09)	5,85 (4,14 - 7,83)	5,49 (3,69 - 6,01)
CD25 ⁺ , кл/мкл	266,45 *** (125,11 - 366,27)	134,80 (90,88 - 188,32)	112,06 (56,61 - 144,38)
Естественные регуляторные T-клетки CD4 ⁺ CD25 ^{hi} , %	1,56 *** (1,14 - 1,97)	5,90 ** (4,96 - 6,71)	7,40 (6,41 - 8,52)
CD4 ⁺ CD25 ^{hi} , кл/мкл	15,55 *** (10,05 - 22,22)	51,16 (32,82 - 66,37)	59,30 (45,82 - 73,88)
ИРИ	1,92 (1,67 - 2,26) *	1,69 (1,43 - 1,93)	1,74 (1,61 - 1,85)
IFN-γ, пг/мл	7,88 *** (4,85-10,30)	12,73 ** (10,12-21,60)	2,35 (1,44-3,99)
IL-4, пг/мл	332,39 § (231,82-401,90)	174,66 ** (97,69-267,33)	1,53 (0,96-1,99)
IFN-γ / IL-4	0,026 *** (0,016-0,046)	0,092 ** (0,066-0,157)	1,44 (1,17-1,69)

Примечания:

1. БА – бронхиальная астма, ИРИ – иммунорегуляторный индекс;
2. *- p<0,01 по сравнению с ремиссией и p<0,05 по сравнению с группой практически здоровых лиц;
3. ** - p<0,001 по сравнению с группой практически здоровых лиц;
4. *** - p<0,001 по сравнению с ремиссией и группой практически здоровых лиц;
5. § - p<0,05 по сравнению с ремиссией и p<0,001 по сравнению с группой практически здоровых лиц.

Показатели апоптоза Лф у практически здоровых лиц и больных БА в периоды обострения и ремиссии заболевания представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Показатели апоптоза Лф у практически здоровых лиц и больных БА в периоды обострения и ремиссии заболевания, процент клеток

Группа	Annexin V ⁺ PI ⁻ % клеток M ± m	Annexin V ⁺ PI ⁻ % клеток Me (25%-75%)	Annexin V ⁺ PI ⁻ % клеток Me (25%-75%)	Annexin V ⁺ PI ⁻ % клеток Me (25%-75%)
Спонтанный апоптоз свежевыделенных Лф				
Больные БА в период обострения (n=25)	18,74 ± 2,28	79,58 (68,68-86,06)	1,21 (0,78-1,85)	1,19 (0,8-1,66)
Больные БА в период ремиссии (n=25)	23,66 ± 2,73	70,96 (60,46-80,25)	2,06 (1,37-4,61)	1,27 (0,76-3,28)*
Здоровые лица (n=20)	20,65 ± 1,22	77,28 (72,42-80,60)	1,38 (1,18-2,34)	0,89 (0,49-1,36)
Спонтанный апоптоз в 72-часовых культурах Лф				
Больные БА в период обострения (n=25)	18,62 ± 1,81●	79,06 (67,63-85,20)●	2,65 (1,09-4,99)●	1,52 (0,87-2,21)
Больные БА в период ремиссии (n=25)	23,67 ± 2,37	67,13 (57,68-74,86)*	5,32 (3,96-6,65)#	3,10 (1,32-9,93)§
Здоровые лица (n=20)	26,60 ± 2,21	59,12 (49,62-61,53)	15,39 (6,73-19,32)	1,37 (0,64-2,23)
Индукцированный ФГА апоптоз в 72-часовых культурах Лф				
Больные БА в период обострения (n=25)	20,29 ± 1,69●●	70,39 ●● (65,4-75,34)	4,52 ● (2,87-7,76)	2,44 ● (1,21-4,19)
Больные БА в период ремиссии (n=25)	41,65 ± 2,38	37,27 (28,27-50,51)	10,74 (4,54-16,62)	4,24 (1,3-11,22)#
Здоровые лица (n=20)	43,02 ± 2,58	43,12 (37,79-51,22)	13,76 (5,55-18,26)	1,12 (0,59-1,81)

Примечания:

1. БА – бронхиальная астма, Лф – лимфоциты периферической крови.
2. * - $p < 0,05$ по сравнению с группой здоровых лиц.
3. ● - $p < 0,05$ по сравнению с ремиссией и $p < 0,01$ по сравнению с группой здоровых лиц.
4. ●● - $p < 0,001$ по сравнению с ремиссией и группой здоровых лиц.
5. # - $p < 0,001$ по сравнению с группой здоровых лиц.
6. § - $p < 0,01$ по сравнению с обострением и $p < 0,05$ по сравнению с группой здоровых лиц.

С целью выявления наиболее информативных для дифференциации двух групп (обострение, ремиссия) количественных признаков выполнялся дискриминантный анализ. В качестве группирующей переменной выступал качественный признак, определяющий принадлежность пациента к одной из двух групп: 1 – «обострение», 2 – «ремиссия». К независимым были отнесены признаки, имеющие наиболее существенные межгрупповые различия по результатам t-критерия Стьюдента или критерия Вилкоксона: ОВФ1 (%), показатели процентного содержания в крови CD25⁺-, CD4⁺CD25^{hi}-клеток, CD8⁺-лимфоцитов, показатель процентного содержания лимфоцитов, находящихся на ранней стадии индуцированного ФГА апоптоза в 72-часовых культурах лимфоцитов (апоптоз), показатель соотношения концентраций цитокинов IFN- γ /IL-4.

В процессе анализа использовалась процедура проведения пошагового дискриминантного анализа с опцией «Casewise» (построчное удаление пропущенных значений). Таким образом, общее число наблюдений, принятых к рассмотрению, составило 45 пациентов. Малая величина $p < 0,001$ свидетельствует о достаточной адекватности выбранной модели. При анализе матрицы классификации установлено, что все 45 пациентов были правильно

отнесены к соответствующим группам. Модель обеспечивает качество распознавания на уровне 100% в каждой из исследуемых групп и является эффективной. В результате канонического анализа были получены стандартизованные коэффициенты для каждой переменной дискриминантной функции (таблица 4).

Таблица 4 – Стандартизованные коэффициенты дискриминантной функции

Признак	Стандартизованные коэффициенты
CD4 ⁺ CD25 ^{hi}	1,037479
Апоптоз	0,711745
IFN/IL-4	-0,458103
CD25 ⁺	0,195293
Собственное значение	5,583795

Определив признаки, которые вносят наибольший вклад в дискриминацию объектов, мы использовали их для построения и анализа уравнений регрессии в целях прогнозирования состояния будущих пациентов. Для прогнозирования вероятности наступления обострения БА использовался логистический регрессионный анализ, поскольку зависимым признаком являлся качественный бинарный признак (имеет только два возможных значения): 1 (наличие обострения) и 0 (отсутствие обострения). Независимыми (объясняющими) признаками являлись показатели процентного содержания в крови CD25⁺, CD4⁺CD25^{hi}-клеток, CD8⁺-лимфоцитов, показатель процентного содержания лимфоцитов, находящихся на ранней стадии индуцированного ФГА апоптоза в 72-часовых культурах лимфоцитов (апоптоз), показатель соотношения концентраций цитокинов IFN- γ /IL-4, а также показатель ОФВ1 (%).

Исходя из взаимной коррелированности ряда признаков, установленной при анализе матрицы корреляций, было принято решение построить несколько моделей логит-регрессии с последующей их оценкой на предмет качества классификации объектов. Построены 5 моделей логит-регрессии со следующими непрерывными переменными: 1) CD4⁺CD25^{hi}; 2) Апоптоз; 3) IFN- γ /IL-4, CD25⁺; 4) CD25⁺, CD8⁺; 5) ОФВ1.

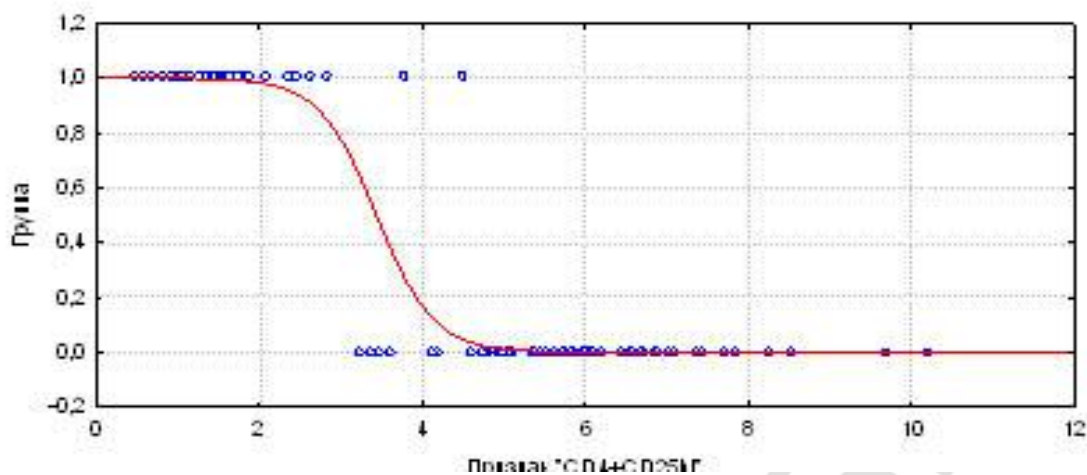
Модель 1. Независимый признак «CD4⁺CD25^{hi}». Высокое значение $\chi^2=133,61$ и малая величина $p<0,001$ свидетельствуют о достаточной адекватности выбранной модели. Получены коэффициенты регрессии $b_0=9,78298$ и $b_1 = -2,8484$.

Регрессионное уравнение

$$Y = \frac{\exp(9,78298 - 2,8484X)}{1 + \exp(9,78298 - 2,8484X)}$$

где X – значение признака «CD4⁺CD25^{hi}».

Графическое представление логит-регрессии для признака «CD4⁺CD25^{hi}» представлено на рисунке 1.



\s

Рисунок 1 – Графическое представление логит-регрессии для признака «CD4+CD25hi»

В данной и последующих логит-моделях значению 1 соответствует группа пациентов в

состоянии обострения БА, значению 0 – в состоянии ремиссии. Если отклик регрессионного уравнения (вероятность) для предсказанного наблюдения $Y \leq 0,5$, то объект относится к группе больных в состоянии ремиссии, если $Y > 0,5$ – в состоянии обострения.

При анализе матрицы классификации наблюдений по признаку «CD4+CD25hi» установлено, что общий процент верных предсказаний составил 96,36%.

Модель 2. Независимый признак «Апоптоз». Значение $\chi^2=38,539$ и малая величина $p < 0,001$, свидетельствуют о достаточной адекватности выбранной модели. Получены коэффициенты регрессии $b_0 = 5,83559$ и $b_1 = -0,19374$.

Регрессионное уравнение

где X – значение признака «Апоптоз».

Общий процент верных предсказаний составил 88,68%.

Модель 3. Независимые признаки «IFN- γ /IL-4» и «CD25+». Критерий $\chi^2 = 38,516$, $p < 0,001$, что говорит о достаточной адекватности модели. Коэффициенты регрессии $b_0 = 1,40005$, $b_1 = 0,107702$ и $b_2 = -54,223$.

$$\text{Регрессионное уравнение } Y = \frac{\exp(5,83559 - 0,19374X)}{1 + \exp(5,83559 - 0,19374X)},$$

где X – значение признака «Апоптоз».

Общий процент верных предсказаний составит 88,68%.

Модель 3. Независимые признаки «IFN- γ /IL-4» и «CD25⁺». Критерий $\chi^2 = 38,516$, $p < 0,001$, что говорит о достаточной адекватности модели. Коэффициенты регрессии $b_0 = 1,40005$, $b_1 = 0,107702$ и $b_2 = -54,223$.

$$\text{Регрессионное уравнение } Z = \frac{\exp(1,40005 + 0,107702X - 54,223Y)}{1 + \exp(1,40005 + 0,107702X - 54,223Y)},$$

где X – значение признака «IFN- γ /IL-4», а Y – значение признака «CD25⁺».

Общий процент верных предсказаний составит 88,89%.

Модель 4. Независимые признаки «CD25⁺» и «CD8⁺». Значение $\chi^2 = 38,016$ и малая величина $p < 0,001$, свидетельствуют о достаточной адекватности выбранной модели; $p < 0,001$ для признака «CD25⁺» и $p < 0,001$ для признака «CD8⁺». Коэффициенты регрессии $b_0 = 2,05909$, $b_1 = 0,280831$ и $b_2 = -0,20392$.

$$\text{Регрессионное уравнение } Z = \frac{\exp(2,05909 + 0,280831X - 0,20392Y)}{1 + \exp(2,05909 + 0,280831X - 0,20392Y)},$$

где X – значение признака «CD25⁺», а Y – значение признака «CD8⁺».

Общий процент верных предсказаний составил 80,91%.

Модель 5. Независимый признак «ОФВ₁». Модель является достаточно адекватной:

$\chi^2 = 10,70548$, $p < 0,01$. Коэффициенты регрессии $b_0 = -1,51050$ и $b_1 = 0,023035$.

$$\text{Регрессионное уравнение } Y = \frac{\exp(-1,5105 + 0,023035X)}{1 + \exp(-1,5105 + 0,023035X)},$$

где X – значение признака «ОФВ₁».

Общий процент верных предсказаний составил 60,81%.

Таким образом, наилучшим образом прогнозирование обострения БА у пациента может быть выполнено по признаку «процентное содержание в крови CD4+CD25hi-клеток», который обеспечивает вероятность верной классификации на уровне 96%. Использование же в качестве переменной только показателя ОФВ1 (%) обеспечивает неудовлетворительное качество прогноза – общий процент верных предсказаний 61%. Остальные рассмотренные признаки также могут быть использованы для прогнозирования, как обеспечивающие достаточный уровень верной классификации (81-89%).

Выводы

1. Период обострения БА характеризуется повышением абсолютного количества CD3+, CD4+-лимфоцитов и снижением относительного количества CD8+-лимфоцитов, в результате чего повышается ИРИ; снижением относительного и абсолютного количества естественных регуляторных Т-клеток (CD4+CD25hi) и повышением относительного и абсолютного количества активированных клеток (CD25+), что сопровождается повышением концентрации IL-4 и снижением концентрации IFN- γ , а также соотношения IFN- γ /IL-4; снижением процента Лф, находящихся на ранней и поздней стадиях спонтанного и индуцированного ФГА апоптоза в 72-часовых культурах Лф, а также снижением показателей ФВД. Для периода ремиссии БА по сравнению с группой практически здоровых лиц характерно снижение процентного содержания CD4+CD25hi-клеток, что сопровождается повышением концентраций IL-4 и IFN- γ и снижением соотношения IFN- γ /IL-4; снижение процента лимфоцитов, находящихся на поздней стадии спонтанного апоптоза в 72-часовых культурах Лф, а также снижение показателей ФВД.

2. Количественными критериями для определения периода БА и прогнозирования обострения заболевания являются показатель процентного содержания в крови естественных регуляторных Т-клеток (CD4+CD25hi) (вероятность верной классификации 96%), показатель процентного содержания лимфоцитов, находящихся на ранней стадии индуцированного ФГА апоптоза в 72-часовых культурах лимфоцитов (вероятность верной классификации 89%), показатели «IFN- γ /IL-4 и CD25+» (вероятность верной классификации 89%), показатели «CD8+ и CD25+» (вероятность верной классификации 81%), тогда как использование всех вышеперечисленных показателей обеспечивает качество распознавания на уровне 100%. Использование же только показателя ОФВ1 обеспечивает неудовлетворительное качество прогноза (общий процент верных предсказаний 61%).

Литература

1. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы (GINA). Пересмотр 2006 г. / под ред. А. Г. Чучалина. М.: «Атмосфера», 2007. 104 с.
2. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека: пособие для врачей-лаборантов / Б. В. Пинегин [и др.]. М., 2001. 53 с.

3. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О. Ю. Реброва. М.: Медиасфера, 2002. 312 с.
4. Chan-Yeung, M. Changes in peak flow, symptom score and the use of medications during acute exacerbations of asthma / M. Chan-Yeung [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1996. Vol. 154. P. 889–893.
5. Melis, M. Fluticasone induces apoptosis in peripheral T-lymphocytes: a comparison between asthmatic and normal subjects / M. Melis [et al.] // Eur Respir J. 2002. Vol. 19. P. 257–266.