

Кріоконсервування фрагментів селезінки свиней у присутності поліетиленоксидів

UDC 615.361.014.41:547.42

S.YE. GALCHENKO*

Cryopreservation of Porcine Spleen Fragments in the Presence of Polyethylenoxides

Проведено дослідження впливу кріоконсервування на біоенергетичні показники фрагментів селезінки свиней. Встановлено, що через 60 хвилин після розморожування фрагментів, які були кріоконсервовані під захистом поліетиленоксидів, спостерігаються нормалізація, а через 120 – значне падіння ендogenous дихання та сполучення дихання з окислювальним фосфорилюванням як в контролі, так і в кріоконсервованих фрагментах селезінки свиней. На 120-у хвилину інтенсивність пероксидації ліпідів у кріоконсервованих фрагментах достовірно перевищує значення контролю.

Ключові слова: кріоконсервування, фрагменти селезінки свиней.

Проведено исследование влияния кріоконсервирования на биоэнергетические показатели фрагментов селезенки свиней. Установлено, что через 60 минут после размораживания фрагментов, кріоконсервированных под защитой полиэтиленоксидов, наблюдаются нормализация, а через 120 – значительное падение эндогенного дыхания и сопряжения дыхания с окислительным фосфорилированием как в контроле, так и в кріоконсервированных фрагментах селезенки свиней. На 120-ю минуту интенсивность пероксидации липидов в кріоконсервированных фрагментах достоверно превышает значение контроля.

Ключевые слова: кріоконсервирование, фрагменты селезенки свиней.

Effect of cryopreservation on bioenergetic indices of porcine spleen fragments was studied. Normalisation of endogenous respiration and its coupling with oxidative phosphorylation to the 60th incubation minute and its significant decrease to the 120th minute were found both in the control and cryopreserved fragments of porcine spleen. The intensity of lipid peroxidation in cryopreserved fragments statistically and significantly exceeds the control value.

Key-words: cryopreservation, porcine spleen fragments.

Фрагменти селезінки свиней (ФСС), в тому числі і кріоконсервовані, знаходять застосування в клінічній практиці [2]. Такі кріопротектори, як ПЕО-400 та ПЕО-1500, дозволяють зберегти на досить високому рівні після відігрівання фрагментів їх ендogenous дихання і запобігають активації перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) при швидкостях охолодження 1 і 1000°C/хв [3, 4]. Але для успішного і безпечного використання фрагментів необхідно знати, як змінюються показники збереження фрагментів ПОЛ в часі після деконсервування.

Мета роботи – визначити вплив кріоконсервування ФСС на збереження деяких показників біоенергетики та інтенсивність ПОЛ в часі.

Матеріали та методи

Селезінку статевозрілих свиней подрібнювали на фрагменти масою 3-5 мг, тричі відмивали фізіологічним розчином (рН 7,4) та додавали розчини кріопротекторів ПЕО-400 і ПЕО-1500 у співвідношенні 1:1 в кінцевій концентрації 10%. Матеріал розфасовували в пластикові контейнери

Porcine spleen fragments (PSFs) including cryopreserved ones find application in clinical practice [2]. Such cryoprotectants as PEO-400 and PEO-1500 enable to preserve their endogenous respiration at quite a high level after fragment thawing and prevent the activation of lipid peroxidation (LPO) at 1 and 1,000°C/min cooling rates [3, 4]. But for successful and safe application of fragments we should know the way of changing in time of indices of LPO fragments preservation after freeze-thawing.

The research was aimed to determine the effect of PSFs cryopreservation on preserving some bioenergetical indices and LPO intensity in time.

Materials and methods

Spleen of mature pigs was minced into 3-5 mg fragments, thrice washed-out with physiological solution (pH 7.4) with adding PEO-400 and PEO-1500 cryoprotectant solutions in 1:1 ratio in 10% final concentration. Material was packed into plastic containers by 1 ml for freezing with 1°C/min rate and into aluminum foil containers by 0.5 ml to be frozen with 1,000°C/min rate. Freezing was done using UOP-

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, м. Харків

* Адреса для кореспонденції: вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.:+38 (057) 372-74-35, факс: +38 (057) 373-30-84, електронна пошта: cryo@online.kharkov.ua

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* Address for correspondence: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+38 (057) 372 7435, fax: +380 57 373 3084, e-mail:cryo@online.kharkov.ua

по 1 мл для заморожування зі швидкістю 1°C/хв і по 0,5 мл – в контейнери з алюмінієвої фольги для заморожування зі швидкістю 1000°C/хв. Заморожування проводили за допомогою програмного заморожувача УОП-6 виробництва СКТБ з ДВ ПКІК НАН України (1°C/хв) або зануренням контейнера в рідкий азот (1000°C/хв). Відігрівали на водяній бані з температурою 37°C. Кріопротектор ПЕО-1500 відмивали фізіологічним розчином, а ПЕО-400 – розчином цукрози з концентрацією 0,25 моль/л з заміною його на середовище Кребс-Рінгера. Інтенсивність дихання визначали полярографічним методом в нмоль O₂/(хв×мг тканини). Для цього в ячейку полярографа, що містила 1 мл середовища Кребс-Рінгера, додавали 10-20 мг фрагментів і динаміку дихання реєстрували на самописці. Кінцева концентрація динітрофенолу (ДНФ) становила 200 мкмоль/мл [5].

Інтенсивність ПОЛ визначали по концентрації ТБК-активних продуктів (ТБКАП), які дають кольорову реакцію з тиобарбітуровою кислотою, за стандартною методикою [1].

За контрольні значення (або норму) в усіх експериментах приймали показники, які були отримані в некріоконсервованих фрагментах селезінки свиней.

Статистична обробка результатів досліджень проводилась за методом Стьюдента-Фішера.

Результати та обговорення

Інтенсивність ендogenous дихання, а також сполучення дихання та окислювального фосфорилування – важливі показники стану ФСС, адже значна частина біологічних процесів є енергозалежною.

Раніше ми дослідили вплив кріоконсервування на інтенсивність ендogenous дихання ФСС, кріоконсервованих без кріопротектора в залежності від концентрації кріопротекторів різної природи: гліцерин (спирт), ДМСО (оксид), ПЕО-1500 і ПЕО-400 (полімери), і швидкості охолодження. Інтенсивність дихання фрагментів селезінки, заморожених без кріопротектора, значно знижується при всіх швидкостях охолодження [3, 4]. При цьому спостерігаються два максимуми досліджуваного параметра (при 1 та 1000°C/хв), але в даному випадку ці максимуми не перевищують 50% від контролю. Тобто заморожування даного біологічного матеріалу у фізіологічному розчині без кріопротекторів не дозволяє зберегти інтенсивність ендogenous дихання тканини після заморожування-відігрівання на достатньому рівні.

Використання кріопротекторів дозволило зберегти більше біоматеріалу після кріокон-

6 programmable freezer produced by Special Designing & Construction Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryo-medicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (1°C/min) or by immersing container into liquid nitrogen (1,000°C/min). Thawing was done on water bath at 37°C. PEO-1500 was washed-out with physiological solution and it was done with 0.250 mol/l sucrose solution for PEO-400 with its substantiation for Krebs-Ringer solution. Respiration intensity was determined using polarographic method in nmol of O₂/(min×mg of tissue). For this purpose in polarographic analyser well, containing 1 ml of Krebs-Ringer solution we added 10-20 mg of fragments with recording respiration dynamics in plotter. Final concentration of dinitrophenol (DNP) made 200 μmol/ml [5].

LPO intensity was determined by concentration of TBA-active products (TBAAP), which provide colour reaction with thiobarbituric acid, using the standard methods [1]. The indices obtained in non-frozen porcine spleen fragments were assumed as control values (or norm) in all experiments. Data were statistically processed using Student-Fisher method.

Results and discussion

Intensity of endogenous respiration, as well as coupling of respiration with oxidative phosphorylation is an important index of PSFs state, although a significant part of biological processes is energy-dependent.

Previously we investigated the effect of cryopreservation on the intensity of endogenous respiration of PSFs, cryopreserved without cryoprotectant and depending on cryoprotectant concentration of different origin: glycerol (alcohol), DMSO (oxide), PEO-1500 and PEO-400 (polymers) and cooling rate. Respiration intensity of spleen fragments, frozen without cryoprotectants reduces considerably at all cooling rates [3, 4]. At the same time two maxima of studied parameter (at 1 and 1,000°C/min) are observed, but in this case they do not exceed 50% of the control. So, freezing of this biological material in physiological solution without cryoprotectants does not allow to preserve the endogenous respiration intensity of tissue after freeze-thawing at a sufficient level.

Application of cryoprotectants allowed to achieve an increase in biomaterial preservation after cryopreservation. At 10% DMSO concentration and 1°C/min cooling rate the respiration intensity was established to make approximately 70% of the control. Augmentation or reduction of cryoprotectant concentration results in a considerable decrease of studied parameter. At such concentration in contrast to 5 and 20% ones the presence of second maximum of preservation is observed within the range of cooling

сервування. Було встановлено, що при концентрації ДМСО 10% і швидкості охолодження 1°C/хв інтенсивність дихання складає близько 70% від контролю. Збільшення або зменшення концентрації кріопротектора призводить до значного зниження досліджуваного параметра. При такій концентрації, у відмінності від концентрацій 5 і 20%, також спостерігається наявність другого максимуму збереження при швидкості охолодження 1000°C/хв. Використання як кріопротектора гліцерину в тих же концентраціях не дозволяє зберегти інтенсивність дихання на прийнятному рівні. При цьому максимум збереження навіть трохи нижче, ніж при використанні ДМСО. Більш високу кріопротекторну ефективність виявляють ПЕО-400 і ПЕО-1500. Їхнє застосування дозволяє зберегти інтенсивність дихання після кріоконсервування на рівні, близькому до контролю при повільних швидкостях охолодження. При цьому ПЕО-400 ефективний у більш широкому діапазоні швидкостей (1-10°C/хв). Таким чином було встановлено, що при заморожуванні фрагментів у присутності поліетиленоксидів ендогенне дихання зберігається на високому рівні відразу після відігрівання матеріалу.

Як видно з табл. 1, ендогенне дихання фрагментів, заморожених зі швидкістю охолодження 1°C/хв, статистично достовірно не відрізняється від контролю. Але при додаванні ДНФ спостерігається незначна стимуляція дихання, а отже і незначне сполучення дихання та окислювального фосфорилування в контролі. У кріоконсервованих фрагментах ці показники значно менші. Але на 60-й хвилині інкубування при практично незмінній інтенсивності ендогенного дихання спосте-

rate of 1,000°C/min. Application of glycerol as cryoprotectant at the same concentrations does not allow preserving respiration intensity at the acceptable level as well. At the same time the preservation maximum is even slightly lower than when using DMSO. PEO-400 and PEO-1500 manifest higher cryoprotective activity. Their application enables to preserve the respiration intensity after cryopreservation at the level close to the control at slow cooling rates. At the same time PEO-400 is efficient within wider range of rates (1-10°C/min). Thus, it has been established that when freezing fragments with polyethylene oxides presence endogenous respiration is kept at a high level just after the material thawing.

As summarised in the Table 1, an endogenous respiration of fragments, frozen with 1°C/min cooling rate does not statistically and significantly differ from the control. But when adding DNP a slight stimulation of respiration and an insignificant coupling of respiration and oxidative phosphorylation in the control are observed. In cryopreserved fragments these indices are significantly lower. However to the 60th incubation minute at a quite unchanged intensity of endogenous respiration the augmentation of V_{DNP}/V_0 ratio up to 1.9 in the control and to 1.9-1.8 in cryopreserved fragments is noted. Consequently, the coupling of respiration and oxidative phosphorylation increases.

To the 120th minute a considerable reduction of studied bioenergetical indices both in the control and cryopreserved fragments is noted. Thus, bioenergetics of both control and cryopreserved fragments changes during their incubation. To the 60th minute a relative recovery of properties of tissue preparations is noted. This state can be maintained for a while and then the

Таблиця 1. Інтенсивність ендогенного (V_0) та в присутності ДНФ (V_{DNP}) дихання ФСС (нмоль O_2 /(хв×мг тканини)) у залежності від умов кріоконсервування та часу інкубації

Table 1. Intensity of endogenous (V_0) and DNP (V_{DNP})-presented respiration of PSFs (nmol O_2 /(min×mg of tissue)) depending on cryopreservation conditions and incubation time

Кріопротектор Cryoprotectant	Швидкість охолодження, °C/хв Cooling rate, °C/min	Час після відігрівання,хв Time after warming,min								
		5			60			120		
		V_0	V_{DNP}	V_{DNP}/V_0	V_0	V_{DNP}	V_{DNP}/V_0	V_0	V_{DNP}	V_{DNP}/V_0
Контроль Control		0,39±0,03	0,62±0,05	1,6	0,32±0,02	0,61±0,05	1,9	0,21±0,02	0,29±0,02	1,4
ПЕО-400 PEO-400	1	0,35±0,04*	0,49±0,03	1,4	0,30±0,03*	0,57±0,05*	1,9	0,15±0,01	0,20±0,02	1,3
	1000	0,27±0,02	0,32±0,03	1,2	0,28±0,02*	0,50±0,04*	1,8	0,09±0,01	0,10±0,01	1,1
ПЕО-1500 PEO-1500	1	0,32±0,03*	0,48±0,04	1,5	0,29±0,03*	0,52±0,05*	1,8	0,10±0,01	0,12±0,01	1,2
	1000	0,23±0,02	0,32±0,02	1,4	0,23±0,02	0,46±0,04*	1,9	0,11±0,01	0,13±0,01	1,2

Примітка: * – відмінності статистично недостовірні в порівнянні з контролем, $p > 0,05$.

Note: * – differences are statistically significant in comparison with the control, $p > 0.05$.

рігається збільшення відношення $V_{\text{днф}}/V_0$ до 1,9 в контролі та до 1,8-1,9 в кріоконсервованих фрагментах. А отже збільшується сполучення дихання та окислювального фосфорилування.

На 120-ту хвилину відмічається значне падіння досліджуваних показників біоенергетики як в контролі, так і в кріоконсервованих фрагментах. Таким чином, біоенергетика як контрольних, так і кріоконсервованих фрагментів змінюється в процесі їх інкубації. На 60-й хвилині спостерігається відносно відновлення властивостей тканинних препаратів. Такий стан може підтримуватися деякий час, а потім процеси катаболізму починають переважати над процесами анаболізму, що показано для тканинних препаратів з багатьох органів [5].

Відомо, що тканинам притаманний рівень ПОЛ, необхідний для регулювання різних функцій організму. Вплив різних ушкоджуючих факторів, у тому числі і заморожування-відігрівання, ініціює й істотно прискорює процес самоокислення органічних сполук, причому механізм самоокислення, спонтанного й індукованого, аналогічний: він розвивається за схемою ланцюгових вільнорадикальних реакцій. Вивчаючи характер перекисних процесів у тканині фрагментів селезінки, ми одержуємо інформацію про процеси, що відбуваються в мембрані на молекулярному рівні після впливу на неї факторів кріоконсервування. Оскільки кріопротектори захищають біологічні структури від впливу несприятливих факторів під час заморожування-відігрівання, а деякі з них мають антиоксидантну активність, було доцільно визначити їхній вплив на інтенсивність ПОЛ у залежності від режимів кріоконсервування.

Оптимальний рівень ПОЛ збільшує інтенсивність електронного транспорту в дихальному ланцюзі і підвищує рівень сполучення окислення і фосфорилування в мітохондріях. Збільшене утворення вільних радикалів в організмі і пов'язане з цим посилення процесів пероксидації ліпідів супроводжується порушеннями властивостей біологічних мембран і функціонування клітин [6, 7]. Зокрема, спостерігається кореляція цього процесу з пригнібленням тканинного дихання [4, 5].

Як видно з табл. 2, кількість ТБКАП у кріоконсервованих фрагментах зберігається на рівні контролю до 60-ї хвилини інкубації, але на 120-й цей показник різко збільшується і статистично достовірно перевищує значення норми. У цей же час відмічалось значне зменшення досліджуваних показників біоенергетики (див. табл. 1). Обидва ці факти треба мати на увазі при оптимізації протоколів кріоконсервування ФСС і при їх використанні.

Таблиця 2. Концентрація ТБКАП (нмоль/мг тканини) в залежності від умов кріоконсервування та часу інкубації ФСС

Table 2. TBAAP concentration (nmol/mg of tissue) depending on cryopreservation conditions and incubation time for PSFs

Кріопротектор Cryoprotectant	Швидкість охолодження, °C/хв Cooling rate, °C/min	Час після відігрівання,хв Time after warming,min		
		5	60	120
Контроль Control		4,1±0,3	5,5± 0,4	7,5± 0,6
PEO-400 PEO-400	1	4,5±0,4	6,9±0,5	13,7±1,2*
	1000	4,4± 0,3	5,4±0,4	12,3±1,1*
PEO-1500 PEO-1500	1	4,1±0,4	6,6±0,5	16,0±1,3*
	1000	4,5±0,4	5,6±0,4	11,5±1,0*

Примітка: * – відмінності статистично достовірні в порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

Notes: * – differences are statistically significant in comparison with the control, $p < 0.05$.

catabolism processes are prevailing the anabolism ones, that is shown for tissue preparations derived from many organs [5].

It is known that the LPO level, essential for regulating different functions of an organism is characteristic to tissues. Influence of various damaging factors, including freeze-thawing initiates and considerably accelerates the process of self-oxidation in organic compounds, moreover the mechanism of spontaneous and induced self-oxidation is similar: it develops by the scheme of free radical reactions. When studying the character of peroxide processes in spleen fragment tissue we obtain the information about the processes, occurring in membrane at molecular level after being affected by cryopreservation factor. Since cryoprotectants protect biological structures against influence of unfavourable factors during freeze-thawing and some of them have an anti-oxidant activity, the determining their influence on LPO intensity depending on cryopreservation regimens is of interest.

LPO optimal level augments the intensity of electron transport in respiratory chain and increases the level of oxidation and phosphorylation coupling in mitochondria. Increased formation of free radicals in organism and related with this strengthening of lipid peroxidation processes are accompanied with disorders in properties of biological membranes and cell functioning [6, 7]. In addition the correlation of this process with inhibiting tissue respiration is observed [4, 5].

As summarised in Table 2, the TBAAP amount in cryopreserved fragments is kept at the control level to

Попередні дослідження з інтенсивності хемілюмінесценції гомогенату фрагментів селезінки, індукованої двовалентним залізом, у залежності від кріопротектора, його концентрації і швидкості охолодження показали, що кріопротектори, які використовувалися в роботі, дозволяють зберегти при деяких режимах заморожування інтенсивність утворення вільних радикалів у тканині на рівні контролю. При цьому максимальна інтенсивність їх утворення спостерігається при швидкості охолодження 100°C/хв. Відзначається також залежність інтенсивності цього процесу від концентрації застосовуваного кріопротектора [3]. Інтенсивність хемілюмінесценції гомогенату фрагментів селезінки, індукованої перекисом водню, в залежності від застосовуваного кріопротектора (PEO-400 або PEO-1500), його концентрації і швидкості охолодження свідчить, що стійкість тканини до перекисного окислювання збільшується зі збільшенням концентрації кріопротектора до 10%.

Таким чином, підбором відповідних кріопротекторів та їх концентрації можна домогтися мінімально ушкоджуючої дії заморожування на ФСС.

Висновки

На 60-ту хвилину після розморожування кріоконсервованих в присутності поліетиленоксидів ФСС досліджені показники біоенергетики та ПОЛ близькі до таких показників у фрагментах, що не піддавалися заморожуванню. Але на 120-й хвилині спостереження рівень ТБКАП різко збільшується і статистично достовірно перевищує значення норми. Відмічалось значне зменшення показників біоенергетики.

Література

1. Арутюнян А. В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: Метод. рекомендации.– СПб., 2000.– 104 с.
2. Бызов В.В. Применение криоконсервированных фрагментов ксеноселезенки в лечении больных с гнойными процессами легких и плевры // Пробл. криобиологии.– 2000.– №1.– С. 81-85.
3. Гальченко С.Е., Мамонтова А.В., Сандомирский Б.П. Влияние режимов криоконсервирования фрагментов селезенки свиньи на интенсивность перекисных процессов // Пробл. криобиологии.– 1998.– №1.– С. 58-61.
4. Гальченко С.Е., Мамонтова А.В., Тыныныка Л.Н., Сандомирский Б.П. Влияние криоконсервирования на интенсивность дыхания фрагментов ксеноорганов // Пробл. криобиологии.– 1998.– №3.– С. 45-48.
5. Лукьянова Л.Д., Балмуханов Б.С., Уголев А.Т. Кислород-зависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние.– М.: Наука, 1982.– 301 с.
6. Шишкина Л.Н., Смотряева М.А. Связь повреждения мембраны и ДНК с процессом перекисного окисления

the 60th incubation minute, but to the 120th minute this index sharply increases and statistically and significantly exceeds the norm values. At the same time a significant reduction of studied bioenergetical indices was noted (see the Table 1). Both these factors should be taken into account when optimising the protocols for PSFs cryopreservation and at their application.

Previous research of hemoluminescence intensity of spleen fragment homogenate, induced by bivalent iron depending on cryoprotectant, its concentration and cooling rate have demonstrated that cryoprotectants, being used in the work enable to preserve under some freezing regimens the intensity of free radical formation in tissue at the control level. At the same time the maximum intensity of their formation is observed at 100°C/min cooling rate. The dependency of this process intensity on concentration of cryoprotectant applied is found [3]. Chemiluminescence intensity of spleen fragment homogenate, induced by peroxide, depending on the cryoprotectant applied (PEO-400 and PEO-1500), its concentration and cooling rate testifies to the fact that the resistance of tissue to peroxidation augments with an increase in cryoprotectant concentration to 10%.

Thus, by selecting the corresponding cryoprotectants and their concentrations we could achieve the minimum damaging freezing effect on PSFs. In addition, the obtained data by dynamics of TBAAP formation in PSFs conform and complete the previous data on CL intensity of the studied material.

Conclusions

To the 60th incubation minute in cryopreserved PSFs at polyethylene oxides presence to the 60th min of observation the studied bioenergetical indices and LPO are close to those in the control. However to the 120th min of observation the TBAAP level sharply increases and statistically and significantly exceeds the norm value. A significant reduction of bioenergetical indices was noted.

References

1. Arutyunyan A.V., Dubinina E.E., Zybina N.N. Methods of assessment of free-radical oxidation and antioxidant system of an organism: Methodical recommendations.– Saint-Petersburg; 2000.– 104 p.
2. Byзов V.V. Application of cryopreserved fragments of xenospleen in treatment of patients with suppurative processes of lungs and pleura // Problems of Cryobiology.– 2000.– N 1.– P. 81-85.
3. Galchenko S.Ye., Mamontova A.V., Sandomirsky B.P. Influence of modes of cryopreservation of porcine spleen fragments on intensity of peroxidation // Problems of Cryobiology.– 1998.– N1.– P. 581-61.
4. Galchenko S.Ye. Mamontova A.V., Tyynyka L.N., Sandomirsky B.P. Cryopreservation effect on the intensity of xenoorgan respiration fragments // Problems of Cryobiology.– 1998.– N 3.– P. 45-48.

липидов при слабых воздействиях // Биофизика.– 2000.– Т. 45, Вып. 5.– С. 844-852.

7. *Matsumura N., Ochi K., Ichimura M. et al.* Study on free radicals and pancreatic fibrosis induced by repeated injections of superoxide dismutase inhibitor // *Pancreas.*–2001.– Vol. 22, N1.– P. 53-57.
5. *Lukyanova L.D., Balmukhanov B.S., Ugolev A.T.* Oxygen-dependent processes in cell and its functional state.– M.: Nauka, 1982.– 301 p.
6. *Shishkina L.N., Smotryaeva M.A.* Relation of damaged membrane and DNA with lipid peroxidation process at slight influences // *Biofizika.*– 2000.– Vol. 45, Issue 5.– P. 844-852.
7. *Matsumura N., Ochi K., Ichimura M. et al.* Study of free radicals and pancreatic fibrosis induced by repeated injections of superoxide dismutase inhibitor// *Pancreas.*– 2001.– Vol. 22, N1.– P. 53-57.

Надійшла 21.02.2005

Accepted in 21.02.2005