

Желчные пути

DOI: 10.16931/1995-5464.2017182-87

Атомно-силовая микроскопия эритроцита при разной степени тяжести механической желтухи (экспериментальное исследование)*Пахомова Р.А.¹, Винник Ю.С.¹, Кочетова Л.В.¹, Воронова Е.А.¹, Нагорнов Ю.С.²*¹ *Кафедра общей хирургии им. проф. М.И. Гульмана Красноярского государственного медицинского университета им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения Российской Федерации; 660022 г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1, Российская Федерация*² *Тольяттинский государственный университет; 445667 г. Тольятти, ул. Белорусская, д. 14б, Российская Федерация***Цель.** Изучить морфофункциональные особенности эритроцита в зависимости от степени тяжести механической желтухи.**Материал и методы.** Механическую желтуху моделировали на 48 минипигах, морфофункциональные особенности эритроцитов изучали с помощью атомно-силового микроскопа ИНТЕГРА Аура фирмы NT-MDT (Россия, Зеленоград).**Результаты.** В результате проведенных исследований доказано, что с нарастанием степени тяжести механической желтухи происходит трансформация эритроцитов. Из двояковогнутого эритроцит превращается в куполообразный стоматоцит. Наряду с эритроцитами с четко контурированной мембраной и цитоплазмой однородной структуры в периферической крови появляются эритроциты с шиповидными выростами на билипидном слое мембраны. Средняя шероховатость поверхности сканов эритроцитов уменьшается с 40–44 до 26–30 нм², а дисперсия монотонно уменьшается с 112 до 84 нм², увеличивается количество нарушений целостности мембраны. Объем эритроцита увеличивается до $12,3 \pm 2,6$ мкм³, внутриклеточное давление возрастает с 0 кПа для нормальных животных до 2,2 кПа у животных с механической желтухой класса С (по Э.И. Гальперину, 2012), что, по всей видимости, способствует разрушению эритроцита.**Заключение.** Структурные и физиологические особенности эритроцитов, а также доступность для исследования делают эритроцит весьма удобной моделью для изучения воздействия экзо-, эндогенных факторов и позволяют использовать эритроцит в качестве информативного тест-объекта для оценки состояния организма при различных патологических процессах, что в свою очередь позволит изучить проблему развития острой печеночной недостаточности при механической желтухе, выявить особенности патогенеза и морфогенеза и найти путь ее решения.**Ключевые слова:** механическая желтуха, печеночная недостаточность, атомно-силовая микроскопия, мембрана эритроцита.**Atomic Force Microscopy of the Erythrocyte in Various Severity of Obstructive Jaundice (Experimental Study)***Pakhomova R.A.¹, Vinnik Yu.S.¹, Kochetova L.V.¹, Voronova E.A.¹, Nagornov Yu.S.²*¹ *M.I. Hulman Department of General Surgery, V.F. Voyno-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation; 1, Partizan Zheleznyak str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation*² *Togliatti State University, 445667 Togliatti, Belorusskaya str., 14b, Russian Federation***Aim.** To study morphofunctional peculiarities of erythrocyte depending on the severity of jaundice.**Materials and Methods.** Obstructive jaundice was modeled in 48 pigs. Morphological and functional characteristics of red blood cells were studied using atomic force microscope INTEGRA NT-MDT (Russia, Zelenograd).**Results.** The study proved that erythrocytes transformation is associated with severity of jaundice. In peripheral blood erythrocytes with clearly contoured membrane and homogeneous cytoplasm are observed along with those of domical shape and with spinous outgrowths on the membrane. Average roughness of red blood cells surface decreases from 40–44 to 26–30 нм², dispersion — from 112 to 84 нм², violations of membrane integrity increased. Erythrocyte's volume increased up to 12.3 ± 2.6 mm³, intracellular pressure — from 0 kPa in normal animals up to 2.2 kPa in animals with obstructive jaundice class C (by E.I. Galperin, 2012) that perhaps contributes to destruction of erythrocytes.**Conclusion.** Erythrocytes are extremely convenient model to study the effect of exogenous and endogenous factors due to their structural and physiological characteristics, as well as the availability to research them. So red blood cell may be used as an informative test object to assess the state of organism in various pathological processes including acute liver failure in obstructive jaundice. Moreover, features of pathogenesis, morphogenesis and optimal management may be determined.**Key words:** obstructive jaundice, liver failure, atomic force microscopy, red blood cell's membrane.

● Введение

Частота заболеваний органов гепатопанкреатодуоденальной зоны, осложненных механической желтухой (МЖ), уступает лишь частоте острого аппендицита и кишечной непроходимости и не имеет тенденции к уменьшению.

Послеоперационная летальность в хирургии желчевыводящих путей достигает 18–20%. Основной причиной, ухудшающей прогноз хирургического лечения больных с механической желтухой, является прогрессирующая острая печеночная недостаточность (ОПН), которая осложняет течение заболевания у 10–25% больных, оперированных по поводу МЖ [1, 2].

В развитии ОПН существенное значение имеют такие факторы, как длительность гипертензии в желчных протоках, возраст больного, уровень билирубина в сыворотке крови и наличие сопутствующей патологии. При этом в гепатоцитах возникают изменения, свойственные некробиозу: отек пространств Диссе, выраженная дистрофия клеток печени со снижением уровня фосфолипидов и концентрации гликогена и развитием очагов некроза в печени. При этом масса функционально активной печеночной паренхимы уменьшается до критического уровня.

Весьма значимым звеном патогенеза формирования клеточных проявлений обструктивных заболеваний гепатобилиарной зоны является эндогенная интоксикация, роль которой в развитии ОПН доказана многочисленными исследованиями. Компенсация эндогенной интоксикации зависит от процессов естественной детоксикации организма, которые происходят в трех функциональных системах — монооксидантной, иммунной и экскреторной. Все детоксикационные системы организма тесно взаимосвязаны, при этом роль “посредника” между ними выполняет система связывания и транспорта токсических веществ [3, 4].

Важным звеном этой системы являются форменные элементы крови. Эритроциты, обладая значительной общей поверхностью, равной примерно 3000 м², принимают участие в процессах адсорбции целого ряда веществ. Нарушения энергетических процессов в эритроците, повреждение его оболочки, изменения в микроокружении способствуют уменьшению энергетического потенциала и соответственно снижению детоксикационной функции [5–7].

Сегодня можно уверенно говорить о том, что эритроциты не только вовлекаются в патологический процесс при гематологических заболеваниях, но и подвергаются серьезным структурным и функциональным изменениям при болезнях различного генеза, особенно при патологических состояниях, сопровождающихся синдромом нарастающей эндогенной интоксикации [5].

Повышенный интерес исследователей к эритроцитам при заболеваниях, сопровождающихся эндогенной интоксикацией, обусловлен их участием в процессах, связанных с поддержанием гомеостаза на уровне организма в целом [8, 9]. Помимо присущей им специфической транспортной функции эритроциты участвуют в регуляции кислотно-щелочного равновесия, водно-электролитного баланса, микрореологического статуса крови, в иммунных реакциях, связывании и переносе аминокислот, липидов, вирусов и лекарственных средств.

Именно поэтому представляет интерес изучение микроструктуры эритроцита и его мембраны, являющегося своеобразной клеточной тест-системой для выявления воздействия эндо- и экзогенных факторов и уникальной моделью состояния организма при МЖ различной степени тяжести.

Цель исследования: изучить морфофункциональные особенности эритроцита в зависимости от степени тяжести МЖ.

Пахомова Регина Александровна — канд. мед. наук, ассистент кафедры общей хирургии им. М.И. Гульмана ГБОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России. **Винник Юрий Семенович** — доктор мед. наук, профессор, заведующий кафедрой общей хирургии им. М.И. Гульмана ГБОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России. **Кочетова Людмила Викторовна** — канд. мед. наук, завуч кафедры общей хирургии им. М.И. Гульмана ГБОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России. **Воронова Елена Александровна** — аспирант кафедры общей хирургии им. М.И. Гульмана ГБОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России. **Нагорнов Юрий Сергеевич** — доцент, канд. физ.-мат. наук, старший научный сотрудник Тольяттинского государственного университета.

Для корреспонденции: Пахомова Регина Александровна — 660118, г. Красноярск, ул. Алексеева, д. 24, кв. 20. Тел.: 8-902-942-39-12. E-mail: PRA5555@mail.ru

Pakhomova Regina Aleksandrovna — Cand. of Med. Sci., Assistant of M.I. Hulman Department of General Surgery, Krasnoyarsk State Medical University. **Vinnik Yuriy Semenovich** — Doct. of Med. Sci., Professor, Head of M.I. Hulman Department of General Surgery, Krasnoyarsk State Medical University. **Kochetova Lyudmila Viktorovna** — Cand. of Med. Sci., Associate Head of M.I. Hulman Department of General Surgery, Krasnoyarsk State Medical University. **Voronova Elena Aleksandrovna** — Postgraduate Student of M.I. Hulman Department of General Surgery, Krasnoyarsk State Medical University. **Nagornov Yuriy Sergeevich** — Associate Professor, Cand. of Phys.-Mat. Sci., Senior Researcher of Togliatti State University.

For correspondence: Pakhomova Regina Aleksandrovna — 20-24, str. Alekseeva, Krasnoyarsk, 660118, Russian Federation. Phone: 8902-942-39-12. E-mail: PRA5555@mail.ru

● Материал и методы

С целью изучения морфофункциональных изменений цитоскелета эритроцита в зависимости от выраженности МЖ и адаптационных реакций организма на декомпрессию желчных путей был проведен эксперимент на 48 минипигах массой $7,05 \pm 0,3$ кг. Все животные содержались в виварии на стандартном питании со свободным доступом к пище и воде. Исследования проводили в одно и то же время суток с соблюдением принципов, изложенных в Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях.

Регулируемую МЖ моделировали по следующей методике. Животных фиксировали к экспериментальному столику в положении на спине и под общим обезболиванием после обработки и подготовки операционного поля выполняли верхнесрединную лапаротомию. После ревизии брюшной полости и печени выделяли общий желчный проток в супрадуоденальном отделе, пересекали его. Вводили Т-образный дренаж, свободный конец которого выводили на холку животного. Для создания МЖ конец дренажа перекрывали. Степень тяжести МЖ оценивали по состоянию животного, а также по уровню билирубина, активности гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП), аспартатаминотрансферазы (АсАТ), аланинаминотрансферазы (АлАТ).

Для того чтобы скоррелировать степень тяжести МЖ человека и животного, определяли соотношение между нормальными значениями билирубина и ГГТП человека и животного. Соотношение “человек/экспериментальное животное” для значений билирубина составило 4/1, для ГГТП — 2/1. Соответственно этому корреляционному индексу экспериментальные животные были распределены на разные классы по степени тяжести МЖ.

В соответствии с модифицированной классификацией Э.И. Гальперина (2012 г.) [2] экспериментальные животные были разделены на 4 группы. В 1-ю (контрольную) группу вошли 12 животных без оперативного вмешательства, во 2-ю группу — животные со степенью тяжести МЖ класса А, в 3-ю — класса В и в 4-ю — класса С. Значения биохимических показателей в зависимости от степени тяжести МЖ представлены в табл. 1.

У всех экспериментальных животных при различных степенях тяжести МЖ была выполнена атомно-силовая микроскопия (АСМ) эритроцита. Мазки крови исследовали на атомно-силовом микроскопе Integra Aura (NT-MDT, Россия). Сканирование поверхности образцов проводили в полуконтактном, а при измерении сил адгезии — в контактном режиме на воздухе. Использовали кремниевые зонды серии NSG01 (NT-MDT, Россия) жесткостью 7,2 нН/нм, резонансной частотой 190 кГц, при этом длина кантилевера составляла 125 мкм, ширина — 20 мкм, толщина — 3 мкм. В работе использовали программное обеспечение АСМ NOVA для получения изображений и программу Image Analysis для анализа изображений. Для анализа сканов использовали метод мазка крови, на котором выбирались только отдельные эритроциты, чтобы исключить механическое воздействие соседних клеток и искажение их морфологии. Число клеток для анализа варьировало в пределах 50–60 эритроцитов для каждого образца, при этом исследуемый эритроцит был сканирован как минимум дважды: первый раз клетка целиком, второй раз — мембрана клетки для анализа ее состояния.

● Результаты и обсуждение

У животных со степенью тяжести МЖ класса А билирубин увеличивался до 6–15 мкмоль/л, активность ГГТП возрастала до 50 Ед/л. Форма цитоскелета эритроцита животных имела форму двояковогнутого дискоцита в 80–90% наблюдений. С нарастанием МЖ форма цитоскелета эритроцита менялась, причем при классе А значимых изменений морфологии клетки не выявлено (рис. 1).

У животных с МЖ класса В значение билирубина увеличилось до 46 мкмоль/л, активность ГГТП — до 193 Ед/л. Форма эритроцита менялась, приобретая горизонтальную ориентацию, на билипидном слое его мембраны появлялись шиповидные выросты (рис. 2).

У экспериментальных животных с МЖ класса С концентрация билирубина была выше 46 мкмоль/л, активность ГГТП — более 193 Ед/л. На фоне увеличения тяжести МЖ трансформация эритроцита нарастала (рис. 3). Цитоскелет эритроцита менялся таким образом, что прогиб мембраны в центре уменьшался и происходило

Таблица 1. Биохимические показатели сыворотки крови экспериментальных животных при разных степенях тяжести механической желтухи

Показатель	Группы животных			
	контрольная	1	2	3
Билирубин, мкмоль/л	3–5	6–12	13–46	>46
ГГТП, Ед/л	До 32	33–50	51–193	>193
АсАТ, Ед/л	До 1,51	1,52–2,31	2,32–2,90	>2,90
АлАТ, Ед/л	До 1,31	1,32–2,19	2,19–2,83	>2,83

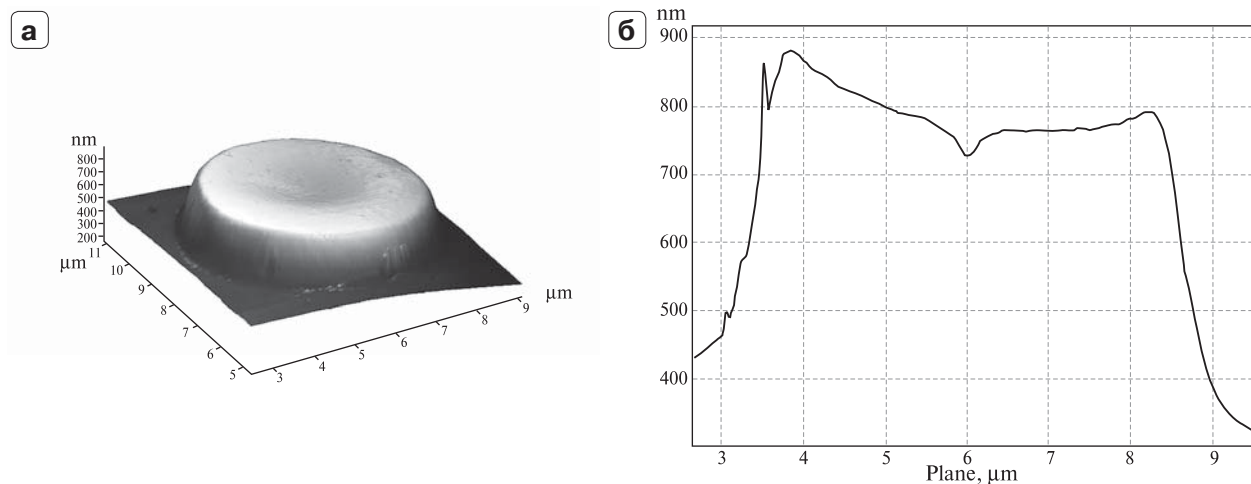


Рис. 1. Форма эритроцита при МЖ класса А. а – сканограмма; б – диаграмма.

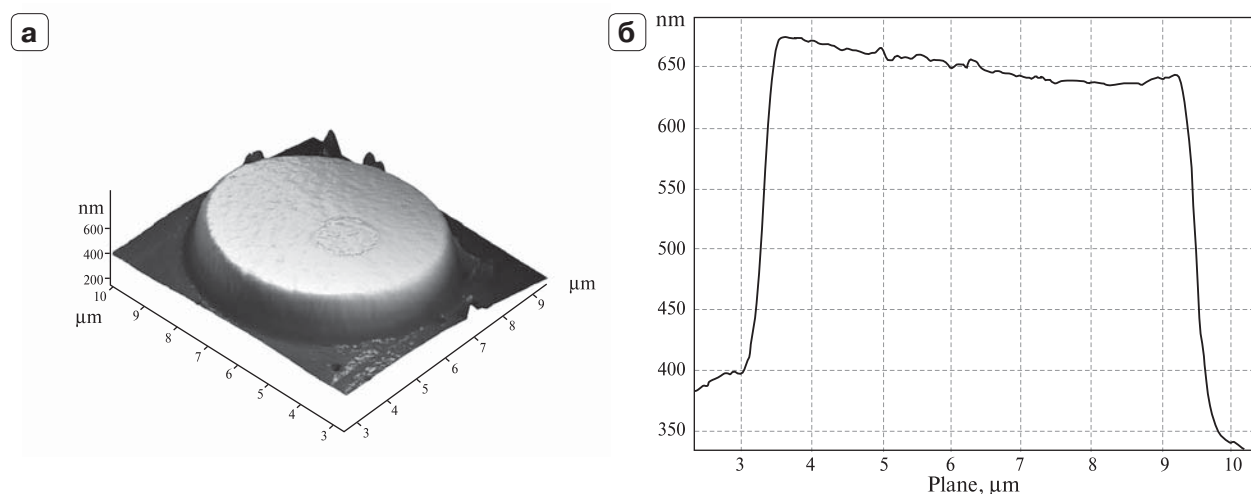


Рис. 2. Форма эритроцита при МЖ класса В. а – сканограмма; б – диаграмма.

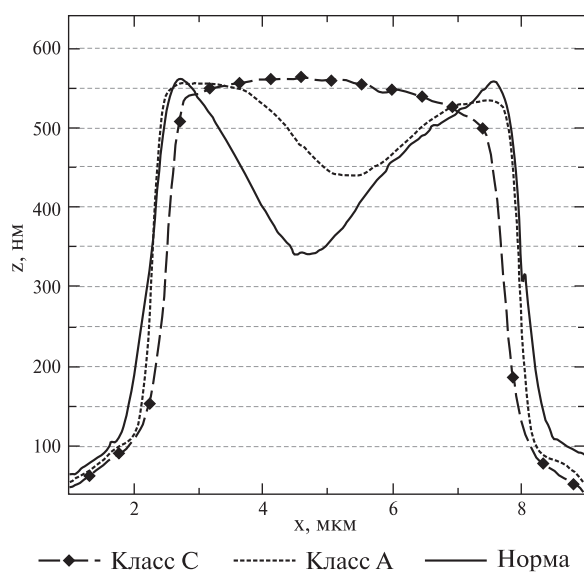


Рис. 3. Диаграмма. Вертикальное сечение эритроцита в норме и при МЖ.

увеличение объема эритроцита, при этом его площадь практически не изменялась (табл. 2).

Наряду с клетками, имевшими четко контурированную мембрану и цитоплазму однородной структуры, в периферической крови появлялись эритроциты с шиповидными выростами на билипидном слое мембраны, увеличивалось количество нарушений целостности мембраны, а самих шиповидных выростов на билипидном слое становилось значительно больше.

Исследование шероховатости поверхности сканов эритроцита с использованием встроенного программного обеспечения NOVA ACM микроскопа показало, что с ростом степени тяжести заболевания средняя шероховатость уменьшалась с 40–44 до 26–30 нм, а дисперсия монотонно снижалась с 112 до 84 нм². Область анализа шероховатости ограничивалась мембраной эритроцита. Данные по шероховатости косвенно подтверждают уменьшение острровершинности мембран.

На рис. 4 показаны вертикальные срезы трехмерного изображения эритроцита, полученные при АСМ, которые отражают трансформацию эритроцита у экспериментальных животных.

Таблица 2. Геометрические параметры и давление в эритроците при разной степени тяжести механической желтухи

Механическая желтуха	Площадь эритроцита, мкм ²	Объем эритроцита, мкм ³	Отношение к нормальному значению объема	Внутриклеточное давление, кПа
Без желтухи	25,0 ± 2,2	7,5 ± 2,0	1,00 ± 0,07	0
Класс А	24,7 ± 2,4	8,8 ± 1,3	1,07 ± 0,09	0,8
Класс В	25,4 ± 2,7	10,2 ± 1,9	1,15 ± 0,11	1,6
Класс С	26,7 ± 2,9	12,3 ± 2,6	1,22 ± 0,16	2,2

Срез мембраны эритроцита при МЖ класса В находится между срезами эритроцитов при МЖ класса А и С, но он не отражен на рисунке, поскольку создает множество пересечений с другими графиками.

На рис. 4 видно, что меняется не только величина прогиба мембраны, но и ее форма — уменьшается островершинность края эритроцита, пропадает линейный участок между центром эритроцита и его краем, координаты максимума на срезе мембраны становятся размытыми. При МЖ класса С прогиб исчезает полностью, а поверхность мембраны эритроцита становится выпуклой. Таким образом, с нарастанием степени тяжести МЖ происходит трансформация эритроцита: двояковогнутый эритроцит превращается в куполообразный стоматоцит.

По всей видимости, увеличение в крови численности трансформированных эритроцитов у животных с МЖ не является случайным фактом, нарушение структуры эритроцита обусловлено состоянием катион-транспортующих систем, сбалансированностью молекулярной организации белковых и липидных компонентов мембраны эритроцита и уровнем аденозинтрифосфата. Эндогенная интоксикация, развивающаяся на фоне МЖ, нарушает биохимические процессы, что в свою очередь вызывает изменения структуры и метаболизма эритроцита.

Программа Image Analysis ACM Integra Aura позволяет определить геометрические параметры эритроцита. Для их установления, расчета

площади и объема, а также внутриклеточного давления применен математический анализ и разработаны формулы. Внутриклеточное давление вычисляли по формуле:

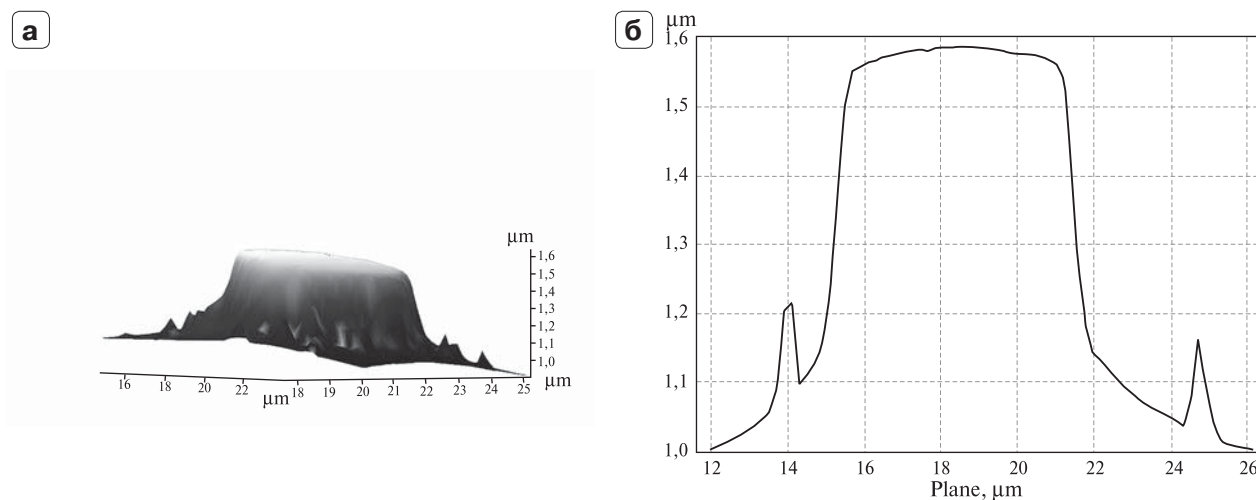
$$\frac{V}{V_0} = \frac{V/S}{V_0/S_0}, \text{ при условии } S = S_0,$$

где V_0 — объем нормального эритроцита, V — значение объема эритроцита на момент исследования.

Подробные математические расчеты площади и объема эритроцита представлены в ранее опубликованных работах [8, 9].

Средняя площадь эритроцита у животных с разным уровнем МЖ практически не изменялась, в то же время объем эритроцитов существенно нарастал и у животных с МЖ класса С составил $12,3 \pm 2,6$ мкм³. Представляются интересными данные, касающиеся увеличения внутриклеточного давления в эритроците, — оно происходит на фоне увеличения объема эритроцита (см. табл. 2).

С нарастанием МЖ количество эритроцитов с увеличенным объемом значительно возрастало. При этом у животных класса С происходит существенное увеличение полуширины распределения, что, вероятно, обусловлено разрушением мембраны эритроцитов. На рис. 5 представлены гистограммы распределения эритроцитов по объему. Значения объемов эритроцитов в норме находятся в диапазоне 5–10 мкм³, а у экспериментальных животных с МЖ класса С они составля-

**Рис. 4.** Форма эритроцита при МЖ класса С. а — объемная диаграмма; б — диаграмма.

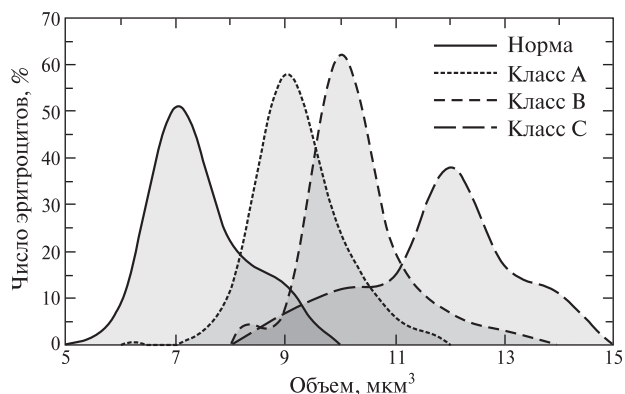


Рис. 5. Гистограмма. Распределение эритроцитов по объему при МЖ.

ют 9–15 мкм³, причем значимое увеличение объема эритроцитов выявлено у животных с МЖ класса В и С. При расчете внутриклеточного давления эритроцитов при МЖ выявили монотонное увеличение этого показателя с нулевого значения, характерного для нормальных животных, до 2,2 кПа у животных с МЖ класса С.

● Заключение

При механической желтухе изменяется цитоскелет эритроцита, достоверно увеличиваются его объем и внутриклеточное давление. Структурные и физиологические особенности, а также доступность для исследования делают эритроцит чрезвычайно удобной моделью для изучения действия экзо-, эндогенных факторов и позволяют использовать его в качестве своеобразного информативного тест-объекта для оценки состояния организма при различных патологических процессах. Морфофункциональные свойства эритроцита являются наиболее общими интегральными показателями функционального состояния организма в целом, дальнейшее исследование изменений цитоскелета эритроцита при разной степени тяжести МЖ с позиции клеточно-организменных взаимодействий позволит изучить проблему развития ОПН при МЖ, выявить особенности патогенеза и морфогенеза и найти путь ее решения.

● Список литературы

1. Винник Ю.С., Пахомова Р.А., Кочетова Л.В. Ближайшие результаты лечения больных с механической желтухой. *Международный научно-практический журнал. Хирургия (Восточная Европа)*. 2012; 3 (03): 31–33.
2. Гальперин Э.И. Классификация тяжести механической желтухи. *Анналы хирургической гепатологии*. 2012; 17 (2): 5–9.
3. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А., Быстрицкий Л.Д., Ткаченко С.Б. *Клинический патоморфоз эритроцита. Атлас*. Томск: Изд-во Томского ун-та; М.: ГЭОТАР-мед, 2003. 208 с.

4. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. *Физиология и патофизиология эритроцита*. Томск: Изд-во Томского ун-та, 2004. 200 с.
5. Скоркина М.Ю., Чернявских С.Д., Федорова М.З., Сладкова Е.А., Забияков Н.А. Методика оценки морфометрических параметров нативных клеток крови с использованием атомно-силовой микроскопии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2010; 150 (2): 273–275.
6. Скоркина М.Ю., Чернявских С.Д., Федорова М.З., Сладкова Е.А., Забияков Н.А. Сравнительная оценка морфофункциональных характеристик нативных и фиксированных эритроцитов. *Цитология*. 2011; 53 (1): 17–21.
7. Новодержкина Ю.К., Шишканова З.Г., Козинец Г.И. *Конфигурация и поверхность клеток крови в норме и патологии*. М.: Триада-Фарм, 2004. 152 с.
8. Нагорнов Ю.С., Пахомова Р.А., Жилиев И.В., Воронова Е.А. Морфология эритроцита и расчет внутриклеточного давления по данным атомно-силовой микроскопии. *Российский журнал биомеханики*. 2015; 19 (4): 1–10.
9. Нагорнов Ю.С., Пахомова Р.А. Атомно-силовая микроскопия мембраны эритроцитов при механической желтухе. *Биофизика*. 2016; 61 (3): 483–491.

● References

1. Vinnik Yu.S., Pakhomova R.A., Kochetova L.V. Early results of treatment of patients with obstructive jaundice. *Mezhdunarodnyj nauchno-prakticheskiy zhurnal. Khirurgiya (Vostochnaya Evropa)*. 2012; 3 (03): 31–33. (In Russian)
2. Galperin E.I. Classification of obstructive jaundice severity. *Annaly khirurgicheskoy gepatologii*. 2012; 17 (2): 5–9. (In Russian)
3. Novitskiy V.V., Ryazantseva N.V., Stepovaya E.A., Bystritskiy L.D., Tkachenko S.B. *Klinicheskij patomorfoz ehritrocita. Atlas* [Clinical erythrocyte pathomorphosis. Atlas]. Tomsk: Publishing house of Tomsk University; Moscow: GEOTAR-med, 2003. 208 p. (In Russian)
4. Novitskiy V.V., Ryazantseva N.V., Stepovaya E.A. *Fiziologiya i patofiziologiya ehritrocita* [Physiology and pathophysiology of the erythrocyte]. Tomsk: Publishing house of Tomsk University, 2004. 200 p. (In Russian)
5. Skorkina M.Yu., Chernyavskikh S.D., Fedorova M.Z., Sladkova E.A., Zabinyakov N.A. Methods of evaluation of morphometric parameters of native blood cells by atomic force microscopy. *Byulleten' ehksperimental'noj biologii i mediciny*. 2010; 150 (2): 273–275. (In Russian)
6. Skorkina M.Yu., Chernyavskikh S.D., Fedorova M.Z., Sladkova E.A., Zabinyakov N.A. Comparative assessment of morphological and functional characteristics of native and fixed erythrocytes. *Citologiya*. 2011; 53 (1): 17–21. (In Russian)
7. Novoderzhkina Yu.K., Shishkanova Z.G., Kozinets G.I. *Konfiguraciya i poverhnost' kletok krovi v norme i patologii* [Configuration and the surface of the red blood cells in norm and pathology]. Moscow: Triada-Farm, 2004. 152 p. (In Russian)
8. Nagornov Yu.S., Pakhomova R.A., Zhilyaev I.V., Voronova E.A. The morphology of the erythrocyte and intracellular pressure calculation according to atomic force microscopy. *Rossiyskiy zhurnal biomekhaniki*. 2015; 19 (4): 1–10. (In Russian)
9. Nagornov Yu.S., Pakhomova R.A. Atomic force microscopy of red blood cells membrane in obstructive jaundice. *Biofizika*. 2016; 61 (3): 483–491. (In Russian)