

ПРАВИТЕЛЬСТВО МОСКВЫ  
ДЕПАРТАМЕНТ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ

СОГЛАСОВАНО

Главный внештатный специалист  
Департамента здравоохранения  
города Москвы по трансплантологии

 М.Ш. Хубутня

\_\_\_\_\_ 2020 г.

РЕКОМЕНДОВАНО

Экспертным советом по науке  
Департамента здравоохранения №8



\_\_\_\_\_ 2020 г.

Иммунологическое обследование доноров органов и пациентов,  
ожидающих трансплантацию органов

Методические рекомендации № 76

Москва 2020

**ISSN**  
**УДК**  
**ББК**  
**К**

**Организация-разработчик:**

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента Здравоохранения города Москвы, Государственное бюджетное учреждение города Москвы «Научно-исследовательский институт организации здравоохранения и медицинского менеджмента Департамента здравоохранения города Москвы»

**Составители:**

**Боровкова Н.В.** – зав. научным отделением биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», доктор мед. наук

**Доронина Н.В.** – врач КЛД, зав. лабораторией иммунотипирования клеток и тканей ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», канд. мед. наук

**Пинчук А.В.** – заведующий организационно-методическим отделом по трансплантологии ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ», заведующий научным отделением трансплантации почки и поджелудочной железы ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», канд. мед. наук

**Рецензенты:**

**Грачева Людмила Александровна** – доктор мед. наук, заведующая лабораторией клинической иммунологии РДКБ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России

**Мойсюк Ян Геннадьевич** – доктор мед. наук, профессор. Руководитель отдела трансплантологии ГБУЗ МО МОНТКИ им. М.С. Владимирского, главный внештатный специалист трансплантолог МЗ МО

**Предназначение:** для врачей трансплантологов, иммунологов, врачей клинической лабораторной диагностики

Методические рекомендации освещают вопросы иммунологического обследования пациентов, ожидающих трансплантацию органов, доноров органов, основные принципы подбора пары донор-реципиент, особенности оценки виртуальной и финальной перекрестной пробы «cross-match».

*Данный документ является собственностью Департамента здравоохранения города Москвы, не подлежит тиражированию и распространению без соответствующего разрешения*

© Департамент здравоохранения города Москвы, 2020

© ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им.  
Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы», 2020  
© Коллектив авторов, 2020

## Содержание

<b>ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ</b>	<b>4</b>
<b>ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ, ВЫПОЛНЯЕМЫЕ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ОРГАНОВ</b>	<b>5</b>
<b>ЗАБОР БИОМАТЕРИАЛА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ И ЕГО ТРАНСПОРТИРОВКА</b>	<b>5</b>
<b>HLA-ТИПИРОВАНИЕ ПАЦИЕНТОВ, ОЖИДАЮЩИХ ТРАНСПЛАНТАЦИЮ ОРГАНА И ДОНОРОВ ОРГАНОВ</b>	<b>8</b>
<b>ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К HLA</b>	<b>9</b>
<b>ПОДБОР ПАРЫ ДОНОР-РЕЦИПИЕНТ НА ОСНОВАНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ HLA-ТИПИРОВАНИЯ</b>	<b>11</b>
<b>ПЕРЕКРЕСТНАЯ ПРОБА (CROSS-MATCH)</b>	<b>12</b>
<b>ОБСЛЕДОВАНИЕ ПАЦИЕНТОВ В ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ</b>	<b>16</b>

## 1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Иммунологическое обследование пациентов, ожидающих трансплантацию органов, и доноров органов направлено на предупреждение отторжения трансплантата. Отторжение трансплантата обусловлено основной функцией иммунной системы, направленной на распознавание и элиминацию из организма чужеродного генетического материала. Иммунный ответ во время отторжения опосредован Т-лимфоцитами и гуморальными иммунными механизмами (продукция антител). Принято выделять три вида реакции отторжения в зависимости от скорости его развития: сверхострое, острое отторжение и хроническая дисфункция трансплантата. Острое отторжение в свою очередь подразделяют на острое гуморальное и острое клеточное отторжение. Сверхострое отторжение трансплантата и острое гуморальное отторжение трансплантата связано с наличием у реципиента преysуществующих антител к антигенам донора. Хроническая дисфункция аллотрансплантата может развиваться в период от 6 месяцев до многих лет после пересадки. Ключевую роль в развитии хронической дисфункции аллотрансплантата играет степень биологической совместимости донора и реципиента по HLA антигенам.

HLA (Human Leukocyte Antigens) представляет собой систему антигенов на поверхности клеток человека, участвующих в презентации антигена клеткам иммунной системы и ответственных за распознавание «свое» и «чужое» в организме. Наиболее значимыми при развитии реакции отторжения при трансплантации органов являются локусы HLA-A, HLA-B, HLA-DR, HLA-DQ. Антигены HLA-A, HLA-B (класс I) обнаруживаются на всех ядерных клетках организма, включая ткани почек, сердца, легких, печени, а также на поверхности тромбоцитов. Антигены HLA-DR, HLA-DQ (класс II) в норме присутствуют только на антигенпрезентирующих клетках.

После переливания крови, беременности или неудавшейся трансплантации у пациентов могут вырабатываться антитела к HLA. Предсуществующая сенсibilизация к HLA осложняет поиск подходящего донора для реципиента, поэтому одной из задач обследования пациентов, ожидающих трансплантацию

органов, является определение наличия (скрининг) и идентификация антител.

Типирование тканей всех реципиентов и доноров, и определение степени соответствия между органами донора и организмом реципиента позволяет гарантировать, что реципиент не получит орган, к которому у него выработались антитела.

## **2. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ, ВЫПОЛНЯЕМЫЕ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ОРГАНОВ**

2.1 Для подбора пары донор-реципиент, пациенту, ожидающему трансплантацию органа проводят следующие анализы:

- HLA-типирование локусов HLA-A, HLA-B, HLA-DR
- Детекция антител к HLA: скрининг, идентификация
- Перекрестная проба с лимфоцитами донора (кросс-матч реакция)

2.3. Обследование донора органов включает HLA-типирование локусов HLA-A, HLA-B, HLA-DR, HLA-DQ.

## **3. ЗАБОР БИОМАТЕРИАЛА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ И ЕГО ТРАНСПОРТИРОВКА**

3.1. Для молекулярно-генетического типирования реципиентов кровь берут из вены в вакутейнер с антикоагулянтом ЭДТА в количестве 2 мл. Нельзя использовать в качестве антикоагулянта гепарин. Образец маркируют и сопровождают направлением на исследование, с указанием необходимой информации, например:

- Фамилии, имени, отчества
- Возраста
- Группы крови (AB0, Rh)
- Клинического диагноза больного
- Даты и времени забора образца

Образец крови для HLA-типирования может быть заморожен при  $-20^{\circ}\text{C}$  и храниться не более 10 дней. HLA-типирование проводится один раз при постановке в лист ожидания органа.

3.2. Для определения антител к HLA используется сыворотка, для получения которой необходимо взять кровь из вены в пробирку без антикоагулянта в объеме 2-5 мл (можно использовать пробирку с активатором свертываемости) и сопроводить направлением на исследование, с указанием необходимой информации, например:

- Фамилии, имени, отчества
- Возраста
- Группы крови (AB0, Rh)
- Клинического диагноза больного
- Вид теста (скрининг HLA антител, идентификация)
- Даты и времени забора образца

Сыворотку замораживают и хранят при  $-20^{\circ}\text{C}$  при необходимости до 3 месяцев, при температуре  $-40^{\circ}\text{C}$  до 1 года. Определение антител проводят при постановке в лист ожидания на трансплантацию органа, и далее один раз в 3-6 месяцев, но не реже одного раза в год. Непосредственно перед трансплантацией органа исследование повторяют.

3.3. При формировании и обновлении «листа ожидания» в лабораторию ежемесячно в плановом режиме в течение месяца предоставляются образцы сыворотки крови реципиентов для постановки перекрестной пробы cross-match. Кровь для перекрестной пробы забирают из вены в пробирку без антикоагулянта в объеме 2-5 мл (можно использовать пробирку с активатором свертываемости) и сопровождают направлением на исследование, с указанием необходимой информации, например:

- Фамилии, имени, отчества
- Возраста

- Группы крови (AB0, Rh)
- Даты и времени забора образца.

В лаборатории отбирают сыворотку крови, маркируют и хранят при температуре  $-40^{\circ}\text{C}$  в течение 1 месяца. Перекрестную пробу с лимфоцитами донора выполняют непосредственно перед операцией.

3.4. Для генетического обследования доноров необходимо взять кровь из вены в вакутейнер с антикоагулянтом ЭДТА в количестве 2 мл. Нельзя использовать в качестве антикоагулянта гепарин. Также для проведения HLA-типирования может быть использован фрагмент селезенки. Образец маркируют и сопровождают направлением на исследование, с указанием:

- Фамилии, имени, отчества
- Возраста
- Группы крови (AB0, Rh)
- Даты и времени забора образца

Образец крови или селезенки для HLA-генотипирования может быть заморожен при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

3.4. Для постановки прямой перекрестной пробы (cross-match) с клетками донора. При трансплантации солидных органов (почек, поджелудочной железы, легких, сердца) необходимо предоставить в лабораторию лимфоциты донора (кровь, взятая в вакутейнер с антикоагулянтом (ЭДТА, цитрат натрия, гепарин), в объеме до 5 мл или фрагмент селезенки или лимфоузла (предпочтительнее).

Образец для исследования маркируют с указанием:

- Фамилии, имени, отчества
- Возраста
- Группы крови (AB0, Rh)
- Даты и времени забора образца

Образцы крови не замораживать, хранить при температуре  $+4-8^{\circ}\text{C}$  не более 6 часов.



3.5. При транспортировке образцов в лабораторию рекомендуется соблюдать следующие требования:

- соответствие положению о больничной безопасности, правилам гигиены труда и технике безопасности;
- обеспечение защиты сотрудников курьерской службы и лабораторного персонала;
- обеспечение целостности подлежащего обработке образца.

Не следует отправлять образцы, внешняя поверхность которых загрязнена кровью или другими жидкостями тела, в этом случае необходимо провести забор другого образца.

#### **4. HLA-ТИПИРОВАНИЕ ПАЦИЕНТОВ, ОЖИДАЮЩИХ ТРАНСПЛАНТАЦИЮ ОРГАНА И ДОНОРОВ ОРГАНОВ**

4.1. Всем пациентам, ожидающим трансплантацию органов (кроме пациентов, ожидающих трансплантацию печени) в плановом порядке проводят HLA-типирование с помощью молекулярных методов низкого разрешения (локусы HLA-A, HLA-B, HLA-DR).

4.2. HLA-типирование доноров следует проводить с помощью молекулярных методов низкого разрешения (локусы HLA-A, HLA-B, HLA-DR и HLA-DQ).

4.3. Современная HLA-номенклатура представлена на веб-ресурсе международной ассоциации иммуногенетиков (<http://hla.alleles.org/nomenclature>). Здесь можно найти информацию о количестве открытых аллелей каждого HLA-локуса и список всех HLA-генов с их молекулярной характеристикой.

## 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К HLA

Первичное обследование пациентов, ожидающих трансплантацию органа, на антитела к HLA включает в себя два этапа.

5.1. Определение антител к HLA – скрининг. На первом этапе, при помощи коммерчески доступных наборов методом мультиплексного анализа на платформе Lumiplex выявляется наличие или отсутствие антител к HLA по классам I и II (скрининг). На рисунке 1 представлен пример скрининга антител к HLA. Результат выражают в средней интенсивности флуоресценции (MFI) и при ее значениях менее 500 у.е. результат оценивают как отрицательный, т.е. антитела к HLA отсутствуют, при 500,0-3000,0 у.е. определяют среднюю степень сенсibilизации, более 3000,0 у.е. – высокую степень сенсibilизации к HLA.

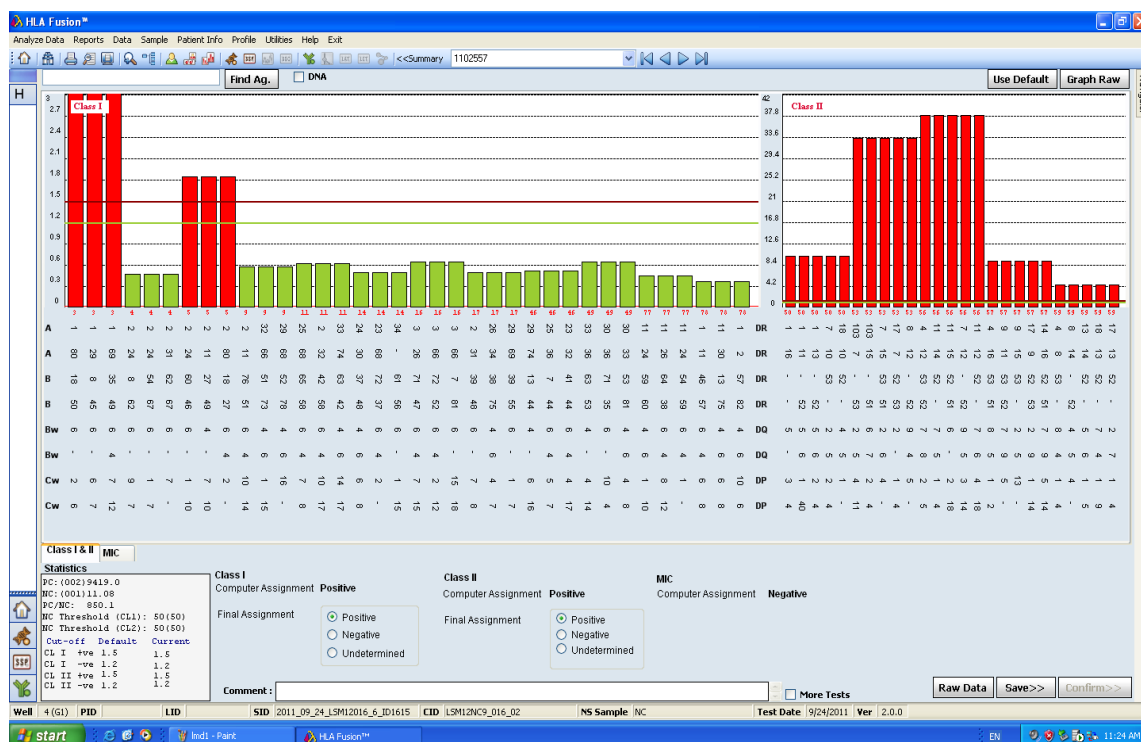


Рисунок 1. Скрининг антител к HLA с использованием реактивов фирмы One Lambda.

Скрининг антител проводят при постановке в лист ожидания на трансплантацию органа, и затем каждые 3-6 месяцев но не реже одного раза в

год. Непосредственно перед трансплантацией органа исследование повторяют.

5.2. Тестирование методом единичных антигенов с помощью Luminex (идентификация антител). Этот метод применяют для идентификации антител с целью проведения виртуальной перекрестной пробы (cross-match). Исследование проводят в обязательном порядке реципиентам сенсibilизированным к HLA или ожидающим повторную трансплантацию органа. Идентификацию антител к HLA рекомендуется выполнять хотя бы один раз каждому пациенту, ожидающему трансплантацию органа (рис. 2).

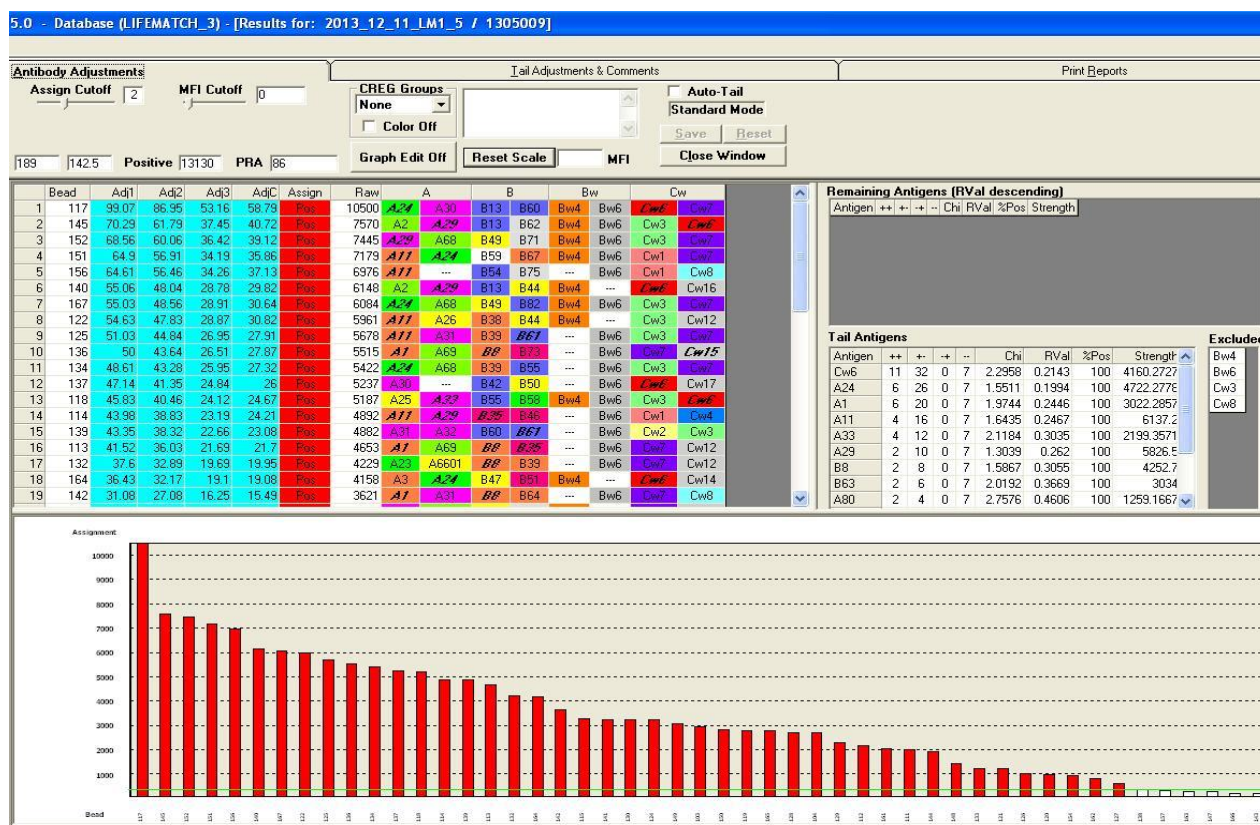


Рисунок 2. Идентификация антител к I классу HLA (реактивы фирмы Immucor)

По результатам этого теста, для каждого положительного реципиента прописывается карта недопустимых донорских антигенов по классу I (локусы HLA-A, B, C) и по классу II (локусы HLA-DR, DQ) для проведения виртуального кросс-матча. Также рассчитывается индекс PRA (%) (панель-реактивных антител в процентах). Физический смысл индекса PRA означает, какой процент потенциальных доноров будет иметь с данным реципиентом положительную реакцию в прямой перекрестной пробе, что позволяет прогнозировать

вероятность и скорость подбора донора для реципиента. Трансплантация органа пациенту с наличием антител к антигенам донора не допустима.

## 6. ПОДБОР ПАРЫ ДОНОР-РЕЦИПИЕНТ НА ОСНОВАНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ HLA-ТИПИРОВАНИЯ

На первом этапе проводят виртуальную перекрестную пробу по результатам HLA-типирования донора органов и данных идентификации антител реципиента. При наличии у реципиента антител к HLA донора трансплантация органа противопоказана (рис. 3).

### Клинический пример

#### Реципиент, мужчина

HLA : A\*02, 03; B\*07, 18; DRB1\*11, 15  
Скрининг – антитела к HLA не выявлены  
Идентификации – антитела к A\*33

#### Донор

HLA: A\*02, 11; B\*40, 52; DRB1\* 04, 11

**Заключение:** виртуальная перекрестная проба отрицательная, трансплантация органа возможна, следует провести финальный cross-match

### Клинический пример

#### Реципиент, женщина

HLA : A\*02, 03; B\*38, 51; DRB1\*08, 15  
Скрининг – антитела к I классу HLA (MFI 15842),  
ко II классу HLA (MFI 1500)  
Идентификация к A\*01, 23, 24, 29, 66(**10**) (MFI  
17200), 80;  
B\***07** (MFI 17399), 15, 27, 40, 42, 44, 45, 54, 55, 56,  
81, 82;  
DRB1\***07** (MFI 2239)

#### Донор

HLA: A\*02, 26(**10**); B\***07**, 13; DRB1\* **07**, 15

**Заключение:** Виртуальная перекрестная проба положительная, трансплантацию органа проводить нельзя

Рисунок 3. Примеры отрицательной и положительной виртуальной перекрестной пробы.

При отсутствии у реципиента антител к антигенам главного комплекса гистосовместимости донора по данному виртуальной перекрестной пробы, переходят к дальнейшему подбору по средством компьютерной программы в следующей приоритетности:

- отсутствие несовпадений по HLA - A, B, DR (full house) (далее обозначается формулой - 000);
- отсутствие несовпадений по HLA - DR и отсутствие или одно несовпадение по HLA - B (далее обозначается формулой - 00 DR и 0/1 B);
- отсутствие несовпадений по HLA - DR в сочетании с несовпадениями по HLA - B (00 DR и 2 B) или одно несовпадение по HLA - DR и отсутствие или одно несовпадение по HLA - B (1 DR и 0/1 B);
- одно несовпадение по HLA - DR и два несовпадения по HLA - B (1 DR и 2B).

Схематично уровни селекции реципиентов для трансплантации донорских почек в зависимости от количества несовпадений по локусам A, B, DR системы HLA между донором и реципиентом отражены ниже в таблице:

Несовпадения (X - отсутствие несовпадения; 0 - несовпадение)	HLA		
	A	B	DR
1	XX	XX	XX
2		XX	XX
3		X0	XX
4		00	XX
5		XX	X0
6		X0	X0
7		00	X0

В результате отбирают 5-7 реципиентов, которым может быть выполнена трансплантация органа, после чего переходят к выполнению финальной

перекрестной пробы.

## 7. ФИНАЛЬНАЯ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ПРОБА (CROSS-MATCH)

Финальную перекрестную пробу с лимфоцитами донора и сывороткой реципиента проводят перед трансплантацией с целью гарантировать отсутствие у реципиента специфических и неспецифических антител к антигенам донора. Для этих анализов используют лимфоциты, полученные из периферической крови или лимфоузлов/селезенки донора. Используют последний образец сыворотки потенциального реципиента.

7.1. Метод комплементзависимой лимфоцитотоксичности. Этот стандартный тест перекрестной совместимости основан на комплемент-опосредованной цитотоксичности. Оценка базовой перекрестной совместимости проводится с помощью лимфоцитов донора. **В этой реакции выявляются антитела только к I классу HLA.** Осуществляют инкубацию сыворотки пациента с клетками донора, а затем добавляют комплемент. Если в сыворотке пациента содержится антитела, направленные против HLA-антигенов донора, то это вызовет лизис клеток, свидетельствуя о положительном результате перекрестной пробы (положительный cross-match). Если антитела к антигенам донора отсутствуют, клетки остаются интактными, и перекрестная проба считается отрицательной (отрицательный cross-match) (рис. 4).

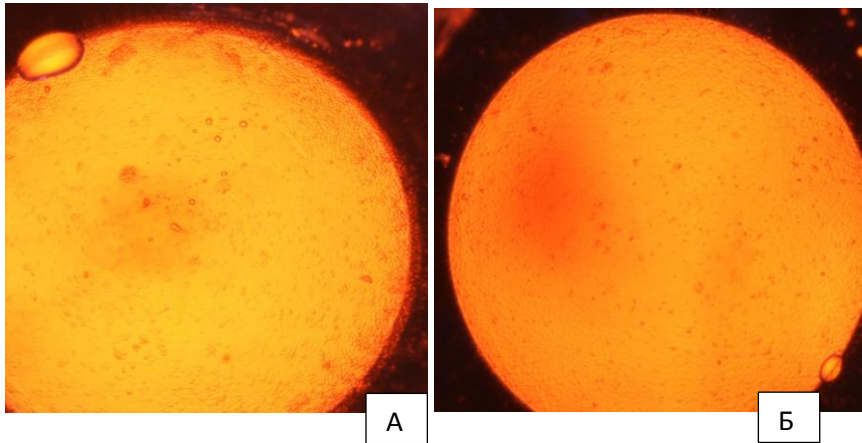
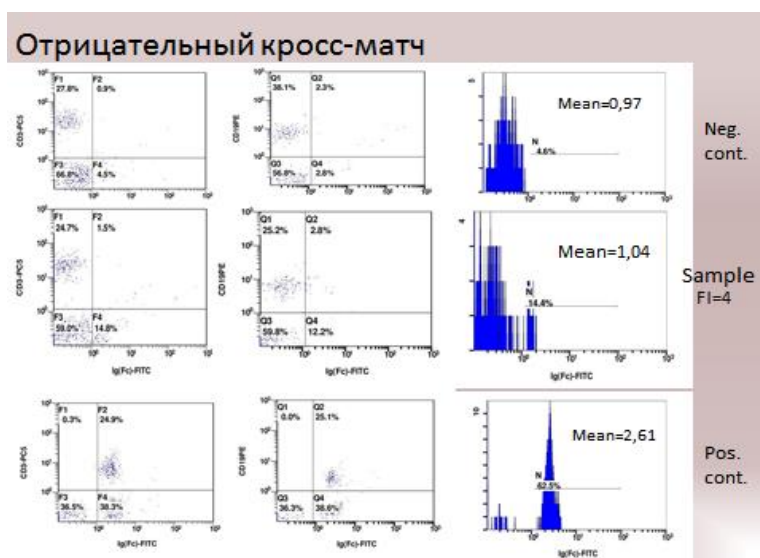


Рисунок 4. Пример отрицательной (А) и положительной (Б) лимфоцитотоксической пробы.

7.2. Оценка перекрестной совместимости с помощью проточной цитометрии. Анализ перекрестной совместимости с помощью проточной цитометрии – это более чувствительный метод по сравнению с лимфоцитотоксическим тестом. Он позволяет определить специфичные антитела IgG к HLA класса I и/или II донора. Тест позволяет выявить также не связывающие комплемент антитела, которые могут остаться незамеченными при лимфоцитотоксической пробе, а также антитела в низком титре. При проведении этой пробы сыворотку пациента инкубируют с лимфоцитами донора. Затем клетки окрашивают флуоресцентными красителями, которые выявляют человеческие антитела IgG на Т (CD3+)- и В (CD19+)-клетках (рис. 5).





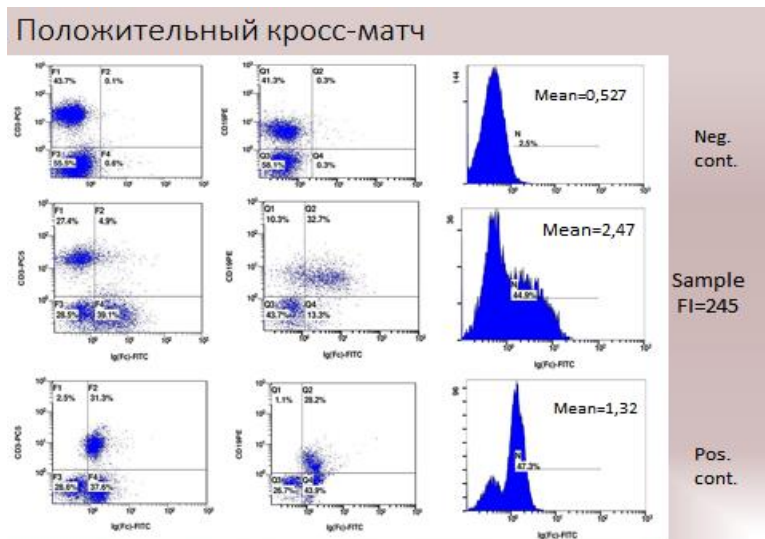


Рисунок 5. Примеры отрицательной и положительной цитометрической перекрестной пробы.

Методика постановки цитометрической перекрестной пробы (Hamrick and Lebeck). В суспензию лимфоцитов донора (приблизительно  $1 \cdot 10^5$ /кл) вносят 30 мкл сыворотки реципиента и инкубируют 30 минут при температуре  $+4^\circ\text{C}$ . Затем три раза отмывают клетки раствором Хенкса для удаления непрореагировавших антител. После в пробирки вносят по 20 мкл моноклональных антител anti-IgG-FITC для выявления антител к HLA связавшихся с В-лимфоцитами (CD19-PE) и Т-лимфоцитами (CD3-PC5). Полученную смесь инкубируют еще 30 минут при  $+4^\circ\text{C}$ , дважды отмывают и ресуспендируют в растворе Хенкса. Готовят три пробы в дублях (С.В. Хайдуков): 1. Лимфоциты донора с негативной сывороткой (негативный контроль), 2. Лимфоциты донора с позитивной сывороткой (положительный контроль) и 3. Лимфоциты донора с исследуемой сывороткой реципиента. Рассчитывают индекс флуоресценции (FI) по формуле:



$$FI = \frac{MEAN(\text{реципиента}) - MEAN(\text{нег. контроль})}{MEAN(\text{поз. контроль}) - MEAN(\text{нег. контроль})} \times 100\%$$

где, MEAN – максимум пика флюоресценции распределения клеток на гистограмме. Тест считается положительным при FI больше 20 %

Интерпретация результатов пробы перекрестной пробы (cross-match). При положительной перекрестной пробе трансплантацию почки, поджелудочной железы, сердца и легких не проводят. Трансплантация печени при положительной перекрестной пробе возможна после обсуждения с хирургом и при проведении методов удаления антител или других форм усиленной иммуносупрессии.

Таким образом, алгоритм обследования пациентов перед трансплантацией органов можно представить следующим образом (рис. 6)



Рисунок 6. Алгоритм обследования пациентов перед трансплантацией

органов

## **8. ОБСЛЕДОВАНИЕ ПАЦИЕНТОВ В ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ**

После трансплантации помимо мониторинга иммуносупрессоров реципиентам проводить определение антител к HLA. Известно, что в 18 % случаев антител к HLA образуются *de novo*. Вновь образовавшиеся антитела влияют на течение посттрансплантационного периода и требуют коррекции иммуносупрессивной терапии. В течение первого месяца сроки проведения скрининга антител определяются наличием антител к HLA до трансплантации и функцией трансплантата.

Пациентам, у которых не выявлялись антитела к HLA до трансплантации и при благоприятном течении посттрансплантационного периода, скрининг антител проводят на 14 сутки, через 3 месяца после пересадки органа и далее ежегодно. Пациенты, у которых не выявлялись предсуществующие антитела к HLA, но при отсроченной функции трансплантата скрининг проводят не ранее 7 суток после трансплантации.

У реципиентов с предшествующей сенсибилизацией при первичной функции трансплантата исследование рекомендуется выполнять на 7 сутки после операции, при отсроченной – на 3-4 сутки. Повышение MFI при скрининге антител к HLA методом мультиплексного анализа на Luminex следует расценивать как неблагоприятный фактор в плане развития реакции отторжения трансплантата. Повышение MFI при скрининге требует также коррекции иммуносупрессивной терапии и служит обоснованием к проведению процедуры плазмафереза.

В посттрансплантационном периоде антитела к HLA определяют также для оценки эффективности иммуносупрессивной терапии и методов экстракорпоральной гемокоррекции.

## Список используемой литературы

1. Eurotransplant Manual© –version 4.6; February 10, 2020,
2. European Federation for Immunogenetics STANDARDS FOR HISTOCOMPATIBILITY & IMMUNOGENETICS TESTING Version 7.0
3. Иммуногенетическое обеспечение трансплантации солидных органов. Клинические рекомендации (проект) – Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы «ФЕДЕРАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ»
4. ACS-guideline-for-flow-cytometric-assesment-of-HLA-alloantibodies – Australasian Cytometry Society Guideline Document, First Edition, 2017
5. Определение антилейкоцитарных донор специфических антител в раннем посттрансплантационном периоде М.Ш. Хубутя, Н.В.Боровкова, Н.В. Доронина; Н.В. Шмарина, Р.В. Сторожев; Л.В. Чудакова // Молекулярная медицина. – 2013. - № 1. – С. 38-41.
6. Идентификация антител к HLA при трансплантации почки: подбор донора для сенсibilизированного реципиента /Н.В. Боровкова, Н.В. Доронина, А.В. Пинчук // Медицинский алфавит. Современная лаборатория. – 2014. – 4. – С. 35-38.
7. Выбор иммуносупрессивной терапии в зависимости от уровня антител к HLA при трансплантации почки / Н.В. Боровкова, А.В. Пинчук, Н.В. Шмарина, Н.В. Доронина, Р.В. Сторожев // Трансплантология. - 2018. - Т.10, №1. - С.35-41.