

УДК 544.7

ВЛИЯНИЕ ХИТОЗАНА НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АЛЬГИНАТА НАТРИЯ

Панов Д. А.

*Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь,
Республика Крым, Россия
E-mail: despanov@gmail.com*

Методами вискозиметрии, рН-метрии и УФ-спектроскопии исследовано влияние низкомолекулярного водорастворимого хитозана на физико-химические свойства низковязкого альгината натрия. Частичная замена альгината натрия хитозаном не вызывает существенных изменений рН и оптической плотности раствора альгината. Однако наблюдается значительное снижение вязкости раствора альгината, что объясняется образованием водорастворимого (нестехиометричного) полиэлектролитного комплекса. При смешивании разбавленных растворов полисахаридов при соотношении компонентов 1:1 образуется нерастворимый (стехиометричный) комплекс, наблюдается резкое снижение относительной вязкости, рН и увеличение оптической плотности альгината.

Ключевые слова: альгинат натрия, хитозан, вискозиметрия, рН-метрия и УФ-спектроскопия, полиэлектролитный комплекс.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время отмечается возрастающий интерес к природным полимерам растительного и животного происхождения, в частности, к полисахаридам (альгинат, пектин, хитозан, каррагинан и другие). Широкое использование этих полимеров связано с их биологическими свойствами – биосовместимостью, способностью к биодegradации, низкой токсичностью, доступностью и дешевой сырьем. Наиболее перспективными биополимерами являются альгинат натрия и хитозан. Альгинаты – природные водорастворимые полисахариды, построенные из остатков β -D-маннурановой и α -L-гулурановой кислот, находящихся в пиранозной форме и соединенных 1→4-гликозидными связями. Соли альгиновой кислоты обладают стабилизирующими и желирующими свойствами, способностью выведения из организма ионов тяжелых металлов [1, 2]. Хитозан – дезацетилированное производное хитина, являющееся вторым распространенным природным полимером после целлюлозы. Хитозан – поликатионный линейный полимер, проявляющий антибактериальные, противоопухолевые, ранозаживляющие свойства [3]. Альгинат натрия и хитозан находят применение практически во всех областях: фармакологии, медицине, биотехнологии, пищевой промышленности и сельском хозяйстве [1–3]. В последние годы ведутся интенсивные исследования по изучению нового класса биополимеров – полиэлектролитных комплексов (ПЭК), разноименно заряженных

полисахаридов. ПЭК биополимеров зачастую обладают другими физико-химическими свойствами и биологической активностью, что значительно расширяет спектр областей применения исходных полимеров. В различных областях промышленности, медицины, фармакологии широко применяются биоразлагаемые ПЭК в качестве носителей биологически активных соединений, пролонгаторов, загустителей, эмульгаторов и наполнителей [4, 5]. Согласно литературным данным образование альгинат–хитозанового комплекса осуществляется за счет электростатических взаимодействий между карбоксильными группами альгината и аминогруппами хитозана, а также за счет водородных связей, возникающих между отдельными макромолекулами и дисперсионных взаимодействий [6–8]. Смесь альгината и хитозана с добавлением солей двухосновных кислот используют для формоустойчивых гидрогелиевых матриц, предназначенных для адресного пролонгированного высвобождения лекарственных препаратов в пораженных полостях [9, 10]. Водорастворимые альгинат-хитозановые комплексы находят применение в рыбной промышленности для стабилизации крабовых палочек и получения высокотехнологичного льда для охлаждения гидробионтов [11].

В литературе последних лет наблюдается рост числа публикаций, в которых альгинат натрия и хитозан выступают в качестве стабилизирующей биополимерной оболочки, покрывающей наночастицы золота, серебра и селена [12–15]. Однако в литературе отсутствуют данные об использовании альгинат–хитозановых ПЭК с целью повышения агрегативной устойчивости наночастиц металлов и неметаллов.

Данная работа является продолжением исследований по поиску природных полимеров для стабилизации агрегативной устойчивости наночастиц серебра и селена. Целью настоящей работы явилось изучение влияния низкомолекулярного водорастворимого хитозана на физико-химические свойства низковязкого альгината натрия. Получение водорастворимого (нестехиометричного) полиэлектролитного альгинат-хитозанового комплекса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали низкомолекулярный водорастворимый хитозан со степенью дезацетилирования около 75% («Биопрогресс», Россия), низковязкий альгинат натрия («BioPolymer», Норвегия).

Растворы соляной кислоты готовили из фиксанала, NaOH (0,05 N) готовили из концентрированных растворов и стандартизировали по щавелевой кислоте. Молекулярные массы и вязкость разбавленных растворов полимеров и их смесей определяли с использованием вискозиметра Оствальда ($d=0,56$ и $0,73$ мм) при температуре 23 °С. Измерения проводили не менее трех раз. Характеристические вязкости исходных полисахаридов определяли экстраполяционным методом из концентрационных зависимостей приведенной вязкости. Средневязкостные молекулярные массы рассчитывали по уравнению Марка-Куна-Хауванка:

$$[\eta] = K \cdot M^{\alpha}, \quad (1)$$

где $[\eta]$ – характеристическая вязкость дл/г, K и α – эмпирические константы; M – средневязкостная молекулярная масса.

Молекулярные массы хитозана определяли в растворе, содержащем в 1 литре 0,33 М уксусной кислоты и 0,3 М хлорида натрия, а альгината натрия – в 0,1 М хлориде натрия [6, 16, 17].

Определение содержания функциональных групп в полимерах проводили согласно методикам [3, 6, 16, 17] потенциометрическим методом на иономере АНИОН 4100 со стеклянным комбинированным электродом ($\Delta=0,05$ рН, $t=23$ °С). Содержание свободных карбоксильных групп (Кс, %) в альгинате натрия рассчитывали по формуле:

$$Kc = \frac{C_{NaOH} \cdot V_{NaOH} \cdot 45}{m_{алг} \cdot 1000} \cdot \frac{V_{колбы}}{V_{ал}} \cdot 100\% \quad (2)$$

где $m_{алг}$ – навеска полисахарида, г; 45 – коэффициент эквивалентности щелочи карбоксильным группам; V_{NaOH} – объем щелочи, пошедший на титрование, мл.

Измерение оптических плотностей растворов индивидуальных полисахаридов и альгинат-хитозановых ПЭК проводили при температуре 23 °С на спектрофотометре Shimadzu UV-1280 (Япония) в диапазоне длин волн от 200 до 700 нм; в режиме сканирования спектра, шаг сканирования составил 1 нм, со стандартными настройками; в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см.

Спектры поглощения были сняты в области 4000–500 $см^{-1}$ на ИК-Фурье-спектрометре фирмы PerkinElmer Spectrum Two (США). Возможности прибора позволяют проводить сканирование в широком диапазоне ИК-спектра 4000–400 $см^{-1}$ (2,5–25 мкм) с малым шагом сканирования. Сила прижимного действия 84 единицы при этом делается 5 сканов. Скорость сканирования 1,4–25,5 мм/с. Альгинат натрия был взят в виде порошка. ИК-спектроскопическим методом определяли соотношение β -D-маннурановой (М) и α -L-гулурановой (G) кислот в альгинате натрия. Наличие в полимерной цепи маннурановой кислоты определяется в ИК-спектре по полосе поглощения валентных колебаний пиранозного кольца 809 $см^{-1}$, а наличие гулурановой кислоты – при 776 $см^{-1}$. Соотношение полос 809 $см^{-1}$ и 776 $см^{-1}$ определяет соотношение количества маннурановых остатков к гулурановым (М/G) [18].

Реакционные смеси готовили смешиванием эквимольных водных растворов альгината натрия и хитозана в объёмных соотношениях от 1:9 до 9:1. Изменение физико-химических свойств альгината в присутствии хитозана изучали вискозиметрическим, рН-метрическим и УФ-спектроскопическим методами

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биологическая активность природных полимеров (хитозана и альгината) зависит от молекулярной массы. Известно, что низкомолекулярные водорастворимые формы хитозана являются перспективными соединениями вследствие их высокой антимикробной активности, биосовместимости с тканями организма и низкой токсичности. На основании характеристических вязкостей исходных полимеров по уравнению (1) были рассчитаны средневязкостные молекулярные массы. Для хитозана она составила 10 кДа, а для альгината – 150 кДа.

На реологические свойства альгината существенное влияние оказывает содержание D-маннуровой и L-гулуриновой кислот. Альгинатный гель не образуется, если содержание гулуриновой кислоты меньше 20–25%. Альгинаты с низким соотношением кислот (M/G) дают более твердый гель, а с высоким – более эластичный. Причем соотношение кислот колеблется в интервале от 0,5 до 3,0 ИК-спектроскопическим методом определили соотношение кислот (M/G), равное 1,04. Таким образом, для данного альгината характерно образование эластичного геля. Потенциометрическим методом по формуле (2) определили содержание свободных карбоксильных групп в альгинате, равное 12,6% (в пересчете на сухое вещество) и аминогрупп в хитозане – 6,0%.

Согласно полученным данным были приготовлены эквимольные разбавленные растворы полисахаридов (в пересчете на функциональные группы), концентрация альгината 0,031 г/дл, а хитозана – 0,050 г/дл. На Рис. 1 представлены кривые изменения вязкости индивидуальных полимеров и их смесей.

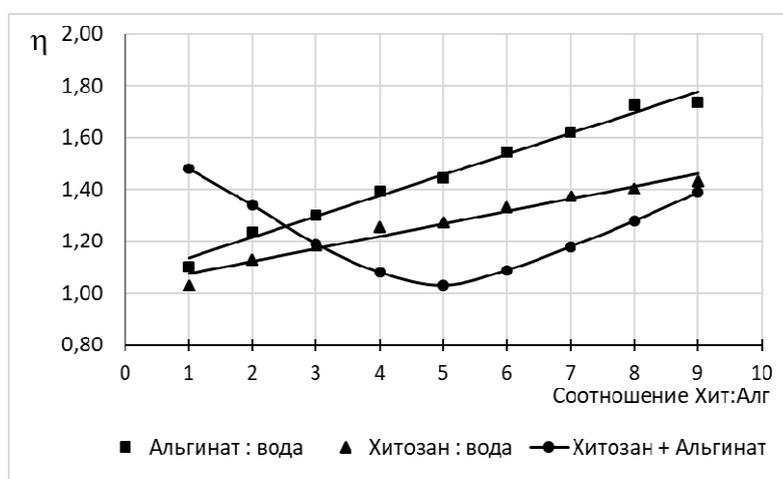


Рис. 1. Зависимость относительной вязкости раствора альгината, хитозана и их смесей от массового соотношения.

С увеличением содержания индивидуальных веществ альгината и хитозана в растворе относительная вязкость возрастает. При рассмотрении изменения вязкости альгината в присутствии хитозана видно, что при добавлении небольших количеств хитозана наблюдается снижение вязкости смеси по сравнению с чистым альгинатом при одинаковой концентрации. Согласно литературным данным это снижение можно объяснить электростатическим взаимодействием полисахаридов, то есть отрицательно заряженные карбоксильные группы альгината блокируются положительно заряженными аминогруппами хитозана, что приводит к снижению гидродинамических свойств раствора альгината. В этом случае альгинат–хитозановая система представляет собой раствор, в котором образуются агрегаты со структурой ядро–оболочка. Ядро образовано ПЭК, а оболочка гидрофильными функциональными группами альгината [6, 18]. Наибольшее снижение

относительной вязкости смеси полимеров наблюдается при соотношении альгината к хитозану, равном 1:1. В данном случае образуется нерастворимый стехиометричный полиэлектролитный комплекс. При дальнейшем прибавлении хитозана относительная вязкость возрастает. Это можно объяснить появлением избыточных количеств аминогрупп в растворе. В избытке хитозана (при соотношении хитозан:альгинат, равном 9:1) ПЭК растворяется. Таким образом, при добавлении хитозана к раствору альгината происходит образованием ПЭК как стехиометричных водонерастворимых, так и нестехиометричных водорастворимых комплексов.

На рисунке 2 представлены кривые изменения рН растворов альгината, хитозана и их смесей.

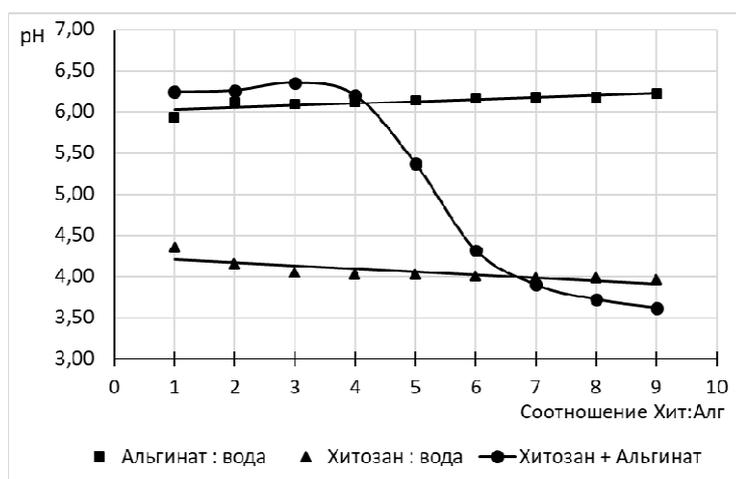


Рис. 2. Изменения рН растворов альгината, хитозана и их смесей при различных соотношениях.

С увеличением концентрации альгината натрия в растворе рН постепенно увеличивается (от 5,94 до 6,18), для хитозана наблюдается, наоборот, снижение рН (от 4,35 до 3,95). При добавлении небольших количеств раствора хитозана к альгинату наблюдается незначительное повышение рН. Это объясняется тем, что в реакции участвуют карбоксильные группы гулурановой и маннуроновой кислот. В области образования стехиометричного ПЭК происходит резкое снижение рН от 6,35 до 5,40). При дальнейшем добавлении избытка хитозана наблюдается дальнейшее снижение рН до 3,62.

Образование водорастворимых и водонерастворимых альгинат–хитозановых комплексов подтверждается УФ-спектроскопическим методом. Следует отметить, что в области длин волн от 200 до 700 нм для индивидуальных полимеров не наблюдается поглощения. На рисунке 3 представлен график изменения оптической плотности смесей альгината с хитозаном в зависимости от соотношения полимеров при длине волны 315 нм.

При добавлении раствора хитозана к альгинату натрия в соотношении хитозан:альгинат, равном 1:9 наблюдается незначительное повышение оптической плотности, равное 0,04, что свидетельствует о формировании растворимых комплексов переменного состава.

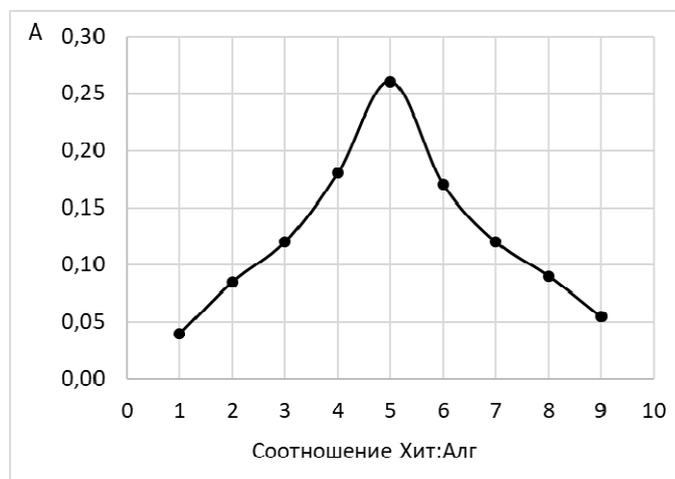


Рис. 3. Зависимость оптической плотности смесей растворов альгината и хитозана при различных соотношениях.

Дальнейшее прибавление хитозана приводит к росту оптической плотности ($A=0,26$) реакционной смеси, что указывает на укрупнение частиц ПЭК и формирование осадка (при соотношении хитозан:альгинат, равном 1:1). При избытке хитозана наблюдается снижение оптической плотности и растворение осадка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Показано, что образование водорастворимого (нестехиометричного) полиэлектролитного комплекса в избытке альгината при соотношении хитозан:альгинат 1:9 приводит к незначительному повышению рН, оптической плотности раствора альгината и снижению относительной вязкости.
2. Образование нерастворимого (стехиометрического) ПЭК хитозан–альгинат происходит при сливании равных объемов эквимольных растворов полисахаридов наблюдается резкое снижение относительной вязкости, рН альгината, однако возрастает оптическая плотность.
3. Полученный водорастворимый альгинат–хитозановый комплекс в избытке альгината может быть использован для стабилизации агрегативной устойчивости наночастиц металлов и неметаллов в слабокислых и нейтральных растворах

Список литературы

1. Хотимченко Ю.С. Физико-химические свойства, физиологическая активность и применение альгинатов-полисахаридов бурых водорослей / Ю.С. Хотимченко, В.В. Ковалев, О.В. Савченко [и др.] // Биология моря. – 2001. – Т. 27, № 3 – С. 151–162.
2. Fabia J. Supermolecular Structure of Alginate Fibres for Medical Applications Studied by Means of WAXS and SAXS Methods / J. Fabia, Cz. Iusarczyk, A. Gawowski // *Fibres & Textiles in Eastern Europe*. – 2005. – Vol. 13, № 5 (53). – P. 114–117.
3. Скрыбин К.Г. Хитозан / (Под редакцией К.Г. Скрыбина, С.Н. Михайлова, В.П. Варламова). – М.: Центр "Биоинженерия" РАН, 2013. – 593 с.
4. Кабанов В.А. Полиэлектrolитные комплексы в растворе и в конденсированной фазе / В.А. Кабанов // *Успехи химии*. – 2005. – Т. 74, № 1 – С. 5–23.
5. Kramarenko E.Y. Stoichiometric polyelectrolyte complexes of ionic block copolymers and oppositely charged polyions / E.Y. Kramarenko, A.R. Khokhlov, P. Reineker // *J. Chem. Phys.* – 2006. – Vol. 125. – P. 1–8.
6. Бровко О.С. Гели полиэлектролитных комплексов на основе альгината натрия и хитозана / О.С. Бровко, И.А. Паламарчук, Н.А. Вальчук // *Журнал физической химии*. – 2017. – Т. 91, № 8 – С. 1420–1425.
7. Бровко О.С. Фильтрующие материалы на основе минеральных волокон с биополимерным слоем / О.С. Бровко, И.А. Паламарчук, Н.В. Сысоева [и др.] // *Лесной журнал*. – 2017. – № 1 – С. 186–194.
8. Peng P. Nanoscale eluting coatings based on alginate/chitosan hydrogels / P. Peng, N.H. Voelcker, S. Kumar, H.J. Griesser // *Biointerphases*. – 2007. – Vol. 2, № 2. – P. 95–104.
9. Манаенков О.В. Получение полислоистых капсул на основе хитозана и солей альгиновой кислоты для инкапсулирования фосфолипидных мицелл / О.В. Манаенков, А.И. Сидоров, В.П. Молчанов // *Вестник МИХТ*. – 2010. – Т. 5, № 2 – С. 76–81.
10. Киржанова Е.А. Микро- и наночастицы из альгината и хитозана для трансмукодадной доставки белка / Е.А. Киржанова, М.А. Печенкин, Н.Б. Демина [и др.] // *Вестник Моск. ун-та, сер. 2. Химия*. – 2016. – Т. 57, № 2 – С. 103–111.
11. Максимова С.Н. Перспективы охлаждения гидробионтов льдом с использованием хитозана и его полиэлектролитных комплексов / С.Н. Максимова, С.Ю. Суровцева, Е.В. Федосеева [и др.] // *Известия ТИПРО*. – 2016. – Т. 186 – С. 231–237.
12. Юркова И.Н. Исследование оптических свойств нанобиокомпозитов на основе серебра и полисахаридов морских водорослей / И.Н. Юркова, Д.А. Панов, В.И. Рябушко // *Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия: Биология, Химия*. – 2009. – Т. 22(61), № 1. – С. 203–207.
13. Панов Д.А. Получение и свойства нанобиокомпозита селена и альгината натрия / Д.А. Панов // *Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология, химия*. – 2017. – Т. 3(69), № 1. – С. 91–98.
14. Юркова И.Н. Наноконпозиция серебра в матрице альгината натрия / И.Н. Юркова, Д.А. Панов // *Тенденции и инновации фундаментальных и прикладных наук (Под редакцией И.Б. Красиной)*. – Ставрополь: Центр научного знания "Логос", 2016. – Т. 3. – С. 98–117.
15. Широкова Л.Н. Макромолекулярные системы на основе полиэлектролитов – производных хитина и наночастиц металлов: автореф. дис. ... канд. хим. наук / Широкова Л.Н. – Москва, 2012. – 24 с.
16. Афанасьев С.П. Модификация титриметрического метода анализа пектиновых веществ / С.П. Афанасьев, Э.П. Панова, Г.Н. Кацева [и др.] // *Журнал Химия природных соединений*. – 1984. – № 4 – С. 428–431.
17. Усов А.И. Альгиновые кислоты и альгинаты. Методы анализа, определение состава и установление строения / А.И. Усов // *Успехи химии*. – 1999. – Т. 68, № 11. – С. 1051–1061.
18. Воронько Н.Т. Реологические свойства гелей желатины с альгинатом натрия / Н.Т. Воронько, С.Р. Деркач, В.Н. Измайлова // *Журнал прикладной химии*. – 2002. – Т. 75, Вып. 5 – С. 808–812.

EFFECT OF CHITOSAN ON THE PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF SODIUM ALGINATE

Panov D. A.

*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russian Federation
E-mail: despanov@gmail.com*

Currently, there is a growing interest in natural polymers of plant and animal origin, in particular, to polysaccharides. The most promising biopolymers are sodium alginate and chitosan, as well as their mixtures – a new class of biopolymers – polyelectrolyte complexes (PEC), oppositely charged polysaccharides. PEC biopolymers often have other physicochemical properties and biological activity, which greatly expands the range of applications of the starting polymers.

Despite the abundance of literature on the use of PEC in various sectors of the national economy and medicine, there are no data in the literature on the use of alginate-chitosan PEC in order to increase the aggregative stability of metal and nonmetallic nanoparticles. This work is a continuation of research on the search for natural polymers to stabilize the aggregative stability of silver and selenium nanoparticles. The purpose of this work was to study the effect of low molecular weight water-soluble chitosan on the physicochemical properties of low viscosity sodium alginate. Obtaining a water-soluble (non-stoichiometric) polyelectrolyte alginate-chitosan complex.

Low-molecular weight water-soluble chitosan with a degree of deacetylation of about 75% (Bioprogress, Russia), low-viscosity sodium alginate (BioPolymer, Norway) were used as objects of study. UV-spectroscopy was performed on a Shimadzu UV-1280 spectrophotometer (Japan). Absorption spectra were recorded on a PerkinElmer Spectrum Two FT-IR instrument (USA).

Based on the conducted research, we can conclude that when small amounts of a dilute solution of low molecular weight water-soluble chitosan are added to a dilute solution of low-viscosity sodium alginate in the ratio of Chit:Alg 1:9, we can speak of the formation of a water-soluble (non-stoichiometric) polyelectrolyte complex in an alginate excess. When merging equal volumes of equimolar solutions of polysaccharides, an insoluble (stoichiometric) PEC is formed.

In the future, the resulting water-soluble alginate-chitosan complex in excess of alginate can be used to stabilize the aggregative stability of metal and non-metal nanoparticles in weakly acidic and neutral solutions.

Keywords: sodium alginate, chitosan, viscometry, pH-metry and UV-spectroscopy, polyelectrolyte complex.

References

1. Khotimchenko Yu.S., Kovalev V.V., Savchenko O.V. Physico-chemical properties, physiological activity and application of alginates – polysaccharides of brown algae, *Biology of the sea*, **27** (3), 151 (2001). (*in Russ.*)
2. Fabia J., Iusarczyk Cz., A. Gawowski Supermolecular Structure of Alginate Fibres for Medical Applications Studied by Means of WAXS and SAXS Methods, *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, **13** (5), 114 (2005).

3. Scriabin K.G., S.N. Mikhailov, V.P. Varlamov Chitosan 593 p. (Center "Bioengineering" RAS, Moscow, 2013). (in Russ.)
4. Kabanov V.A. Polyelectrolyte complexes in solution and in the condensed phase, *Successes of Chemistry*, **74** (1), 5 (2005). (in Russ.)
5. Kramarenko E.Y., Khokhlov A.R., Reineker P. Stoichiometric polyelectrolyte complexes of ionic block copolymers and oppositely charged polyions, *J. Chem. Phys.*, **125**, 1 (2006).
6. Brovko O.S., Palamarchuk I.A., Valchuk N.A. Gels of polyelectrolyte complexes based on sodium alginate and chitosan, *Journal of Physical Chemistry*, **91** (8), 1420 (2017). (in Russ.)
7. Brovko O.S., Palamarchuk I.A., Sysoyeva N.V. Filter materials based on mineral fibers with a biopolymer layer, *Forest Journal*, **1**, 186 (2017). (in Russ.)
8. Peng P., Voelcker N.H., Kumar S., Griesser H.J. Nanoscale eluting coatings based on alginate/chitosan hydrogels, *Biointerphases*, **2** (2), 95 (2007).
9. Manaenkov O.V., Sidorov A.I., Molchanov V.P. Preparation of multi-layer chitosan-based capsules and alginic acid salts for encapsulating phospholipid micelles, *MIHT Bulletin*, **5** (2), 76 (2010). (in Russ.)
10. Kirzhanova E.A., Pechenkin M.A., Demina N.B., Balabushevich N.G. Micro- and nanoparticles from alginate and chitosan for transmucosal protein delivery, *Herald Mosk. un-that, ser. 2. Chemistry*, **57** (2), 103 (2016). (in Russ.)
11. Maksimova S.N., Surovtseva S.Yu., Fedoseeva E.V. Prospects for cooling of hydrobionts with ice using chitosan and its polyelectrolyte complexes, *Izvestia TINRO*, **186**, 231 (2016). (in Russ.)
12. Yurkova I.N., Panov D.A., Ryabushko V.I. Investigation of optical properties of nanobiocomposites based on silver and polysaccharides of seaweed, *Scientific notes of the V.I. Vernadsky Taurida National University. Series: Biology, Chemistry*, **22** (1), 203 (2009). (in Russ.)
13. Panov D. A. Selenium and sodium alginate nanocomposites producing and properties, *Scientific notes of the V.I. Vernadsky Taurida National University. Series: Biology, Chemistry*, **3** (1), 91 (2017). (in Russ.)
14. Yurkova I.N., Panov D.A. Nanocomposition of silver in a matrix of sodium alginate, *Trends and innovations of fundamental and applied sciences*, **3**, 98 (2016). (in Russ.)
15. Shirokova L.N. Macromolecular systems based on polyelectrolytes - derivatives of chitin and metal nanoparticles: author. dis. ... cand. chemical sciences 24 p. (Moscow, 2012). (in Russ.)
16. Afanasyev S.P., Panova E.P., Katseva G.N. Modification of the titrimetric method of analysis of pectin substances, *Journal of Chemistry of Natural Compounds*, **4**, 428 (1984). (in Russ.)
17. Usov A.I. Alginic acids and alginates. Methods of analysis, composition and determination of the structure, *Successes of Chemistry*, **68** (11), 1051 (1999). (in Russ.)
18. Voronko N.T., Derkach S.R., Izmailova V.N. The logical properties of gelatin gels with sodium alginate, *Journal of Applied Chemistry*, **75** (5) 808 (2002). (in Russ.)