

研究简报

DOI号: 10.3724/SP.J.0000.2009.40767

稀有鯽鱼细胞系的建立及其作为测定重金属毒性模型的探讨

谭凤霞¹ 杨方星² 王卫民¹ 王 敏¹ Yuan an Lu³

(1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430070;

3. 夏威夷大学, 公共卫生健康实验室, 夏威夷 96822)

A NEW FISH CELL LINE OF FIN ESTABLISHED FROM RARE MINNOW AS VERSATILE TOOL IN ECOTOXICOLOGY ASSESSMENT OF CYTOTOXICITY OF HEAVY METALS

TAN Feng-Xia¹, YANG Fang-Xing², WANG Wei-Min¹, WANG Min¹ and LU Yuan-An³

(1. Fisheries College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070; 2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430070; 3. Department of Public Health Sciences, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, HI 96822, USA)

关键词: 细胞培养; 稀有鯽鱼细胞系; 重金属; 毒性检测

Key words: Cell culture; The rare minnow fin cell line (RMF); Heavy metal; Toxicity assay

中图分类号: Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2009)04-0767-05

稀有鯽鱼 (*Gobio cyprinus rarus*) 是我国特有的小型鲤科鱼类, 自然分布于四川省彭州市、都江堰市、汉源县、石棉县、双流县等地, 从 1990 年开始, 中国科学院水生生物研究所对其分布区域、生物学、遗传纯化、饲养管理方法和繁殖技术等方面进行了大量的研究工作, 是我国近十几年开始使用的一种优良的实验鱼。稀有鯽鱼具有体型小、生命力强、饲养简便、不易染病、性成熟期短、繁殖季节长、产卵频率高等特点^[1]。另外, 稀有鯽鱼具有窒息点低, 耐受低溶氧能力强^[2], 对温度适应性强, 其成体温度适应范围为 0—35[°]^[3] 等作为鱼类实验动物的优点, 目前已逐渐成为一种毒理学模式生物。

水生动物(主要为鱼类)的细胞培养研究晚于陆地生物, 以建立永生性细胞系为目的的鱼类细胞培养研究始于 20 世纪 60 年代, 至今已有近 50 年的历史。鱼类细胞系可以对不同的环境污染物/致癌物产生反应, 这表明鱼类细胞系已经具备用作研究水体中不同污染物毒性的细胞模型的条件^[4,5]。鱼类细胞系是进行污染物毒性早期检测的模型之一^[6], 是毒理学研究的常用手段之一。用鱼类细胞系来评价其对毒性物质的反应有两种不同的毒性效应, 一是细胞毒性效应^[7—9], 一是基因毒性效应^[10—12]。

本文主要介绍稀有鯽鱼细胞系 RMF 的建立, 探讨

新建细胞系的最适生长条件, 染色体和线粒体基因鉴定其种类来源, 并比较其不同生长代数对四种重金属镉、铬(VI)、锌、铜的毒性及其敏感性, 探讨其作为毒理学研究体外模型的可行性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 液体培养基 M199、MEM、DMEM、RPMI-1640、L-15、胰蛋白酶、G408、两性霉素 B、PBS、胎牛血清 (FBS)、表皮生长因子 (EGF)、成纤维生长因子 (FGF)、秋水仙素购自 Sigma 公司; 硫酸庆大霉素、Tris 碱、EDTA、EDTA-2Na、SDS、溴化乙锭 (EB)、dNTP (10 mmol/L)、MTT 购自 Amresco 公司; Tag 酶购自 Fermentas 公司; DNA mark (100 bp)、DNA 提取试剂盒购自 TOYOBO 公司; 琼脂糖购自 Biowest 公司; 氯化镉 (CdCl₂ · 2.5H₂O)、重铬酸钾 (K₂Cr₂O₇)、氯化锌 (ZnCl₂)、硫酸铜 (CuSO₄ · 5H₂O)、二甲基亚砜 (DMSO) 等其他试剂为国产分析纯试剂。

1.2 主要仪器 CO₂ 培养箱, 倒置荧光显微镜及拍照系统, 离心机, 光学显微镜及拍照系统, 德国 CASY 细胞计数仪, AmpliTaq PCR 仪, 凝胶成像系统及凝胶分析软件, 酶标仪, 电子天平, 生化培养箱和超净工作台等。

1.3 细胞培养 稀有鯽鱼 4 尾 (体重 1.2—1.8 g, 体长 35—

收稿日期: 2008-06-23; 修訂日期: 2009-02-12

基金项目: 湖北省科技攻关课题 (2005AA401C41); 农业部 948 课题 (2005Z37) 资助

作者简介: 谭凤霞 (1979—), 女, 山东潍坊人, 博士, 主要从事细胞毒性检测研究。E-mail: tanfengxia2008@163.com

通讯作者: 王敏 (1956—), 研究员, E-mail: wangmin@mail.hzau.edu.cn

45 mm), 取自中国科学院水生生物研究所。按组织块贴壁法, 用 L-15液体混合培养基, 放入 25 培养箱中进行原代培养。每天观察细胞从组织块周围长出的情况, 待从组织块长出的细胞均匀铺满培养瓶底部时, 消化离心收集细胞, 进行传代培养。

1.4 最适生长条件选择 细胞传至 10代时, 调整各瓶的细胞密度为 1×10^5 瓶, 分别放在 15、20、25、30 的培养箱中培养, 进行最适生长温度的选择试验; 细胞传至 15代时, 分别用含浓度为 0%、5%、10%、15%、20% FBS的培养液调整各瓶的细胞密度为 1×10^5 瓶, 于 25 的培养箱中培养, 进行最适 FBS浓度的选择试验; 细胞传至 20代时, 分别用含 10% FBS的 M199、MEM、DMEM、RPM-1640和 L-15培养液调整各瓶的细胞密度为 1×10^5 瓶, 于 25 的培养箱中培养, 进行最适培养基的选择试验。每天从各个培养箱中取出 3 瓶细胞消化制成细胞悬液, 用细胞计数仪进行计数, 每项选择实验连续进行 1周, 绘制其生长曲线。

1.5 细胞的染色体分析 对数生长期的细胞, 按 Earley^[13] 进行染色体分析。

1.6 细胞 18S rRNA 和细胞色素 b 的基因分析 取对数生长期的细胞, 按照 DNA 提取试剂盒的说明书提取基因组 DNA, 进行 PCR 扩增, 扩增产物送上海博亚公司进行产物纯化和测序。

引物设计所用的基因序列均源于 GeneBank 数据库, 根据其基因序列利用 Primer 5.0设计引物, 由上海生物工程公司合成, 如下:

18S rRNA 基因 (EF190321)

上游引物: 5' AGCGATTGTCTGGITCA TT 3'

下游引物: 5' AACGCCACTTGTCCCTCT 3'

产物: 107 bp

Cytb 基因 (AF375865)

上游引物: 5' CCA TACA TTACACTTCCGACAT 3'

下游引物: 5' TA TCTGCCACGAGGGTTC 3'

产物: 840 bp

1.7 MTT 检测重金属的毒性 稀有鈎鰍 RMF 细胞系在其传代培养的 4th、9th、14th、19th 收集细胞, 接种到 96 孔板进行 5th、10th、15th、20th 传代细胞的重金属毒性敏感性检测^[14]。

1.8 数据分析 所有数据采用 Statistic 6.0 (StatSoft Software, USA) 软件进行统计分析, 结果以平均值 ± 标准差表示, 差异显著性用 *t* 检验分析 ($p < 0.05$)。

2 结果

2.1 细胞生长动态

组织块接种到原代培养瓶后肉眼观察, 组织块均能很好的贴壁, 只见少量脱落现象。从第 2 天开始, 每天在倒置显微镜下观察细胞的长出情况, 发现组织块边缘第 2 天就有细胞长出。这些细胞长势迅猛但轮廓不太清晰, 可能是黏液细胞, 几天后发现这些慢慢死掉。在这些细胞死掉之后从组织块下面长出的细胞形态健康, 轮廓清晰, 经过 34d 就可以形成有规模的细胞克隆 (图 1A), 再经过 5—6d 就能在组织块

之间形成细胞单层, 这时就可以用 TVS 消化进行第一次传代培养。

原代细胞经 TVS 分次消化 2—5 min 后, 大多数细胞边缘卷起, 脱离瓶壁变圆, 收集细胞后接种于新的培养瓶中进行传代培养, 细胞在 24h 后基本能贴壁。视初次传代接种的细胞密度, 细胞 5—8d 接近长满瓶壁, 倒置显微镜下观察, 细胞呈短梭形。经过 3—5 次传代后, 细胞逐渐长成整齐的成纤维状细胞 (图 1B)。细胞在传代 8 次以后, 就能在 25 下很容易保持其快速生长。

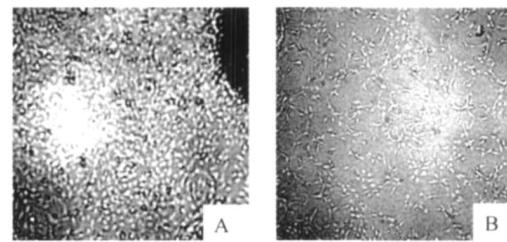


图 1 稀有鈎鰍 RMF 的细胞形态观察

Fig. 1 Photomicrography of RMF derived from rare minnow

A. 原代细胞; B. 5th 细胞; 放大倍数, 50 ×

A. primary cells; B. 5th cells; Magnification, 50 ×

2.2 最适生长条件的选择

为了确定新建稀有鈎鰍细胞系 RMF 最佳生长温度, 进行了 15、20、25、30 4 个生长温度的梯度实验, 结果表明细胞生长具有温度依赖性 (图 2)。从图中可以看出, RMF 细胞在 4 种温度下均能生长, 细胞生长和增殖情况经统计分析可以看出, 细胞在 25 时的生长和增殖情况显著优于其他 3 种温度 ($p < 0.05$), 进一步分析可得, 细胞在 20 时的生长和增殖情况显著好于 15 和 30 ($p < 0.05$)。

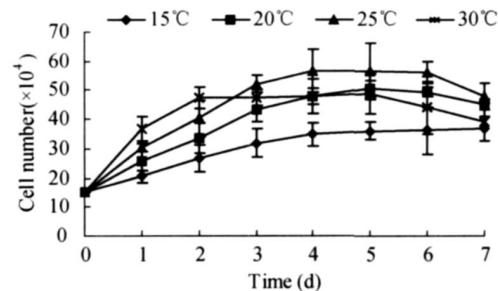


图 2 RMF (10th) 细胞在添加 20% FBS 的 L-15 培养液的条件下对生长温度的选择

Fig. 2 Growth kinetics of RMF (10th) in medium supplemented with 20% fetal bovine serum at selected incubation temperatures

RMF 细胞系在不同的血清浓度下的生长情况显示 (图 3), 细胞在 20% FBS 下生长速度最快, 倍增时间大概为 24h, 细胞在 15% FBS 下的倍增时间大概为 30h, 而在 10% FBS 下细胞的倍增时间接近 36h。细胞在 5% FBS 下生长速度非常缓慢, 在无血清的情况下几乎看不到生长。可见细胞在

10%以上的血清浓度下可较好的生长,细胞的生长速度与血清浓度具有相关性。

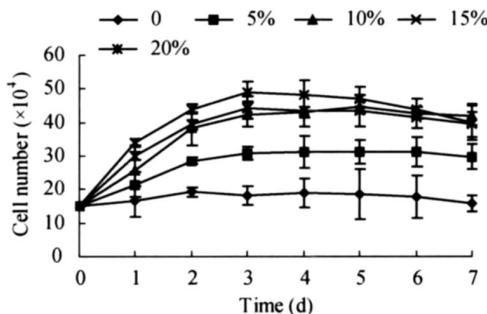


图 3 RMF(15th)在 L-15 培养液中 25℃下对不同血清浓度的选择

Fig. 3 Growth curves of RMF (15th) in L-15 medium supplemented with different concentrations of FBS at 25

RMF对不同培养液的选择(图 4),结果表明 RMF细胞系在所选择的 5 种培养液中均能生长,但生长情况有所差异。在 M199 和 L-15 培养液中的生长情况显著优于其他 3 种培养液 ($p < 0.05$),进一步研究表明,L-15 培养液中细胞的生长情况稍优于 M199。在 MEM 培养液中的生长情况优于 DMEM 和 RPM-1640 培养液 ($p < 0.05$),其最适培养液为 L-15。

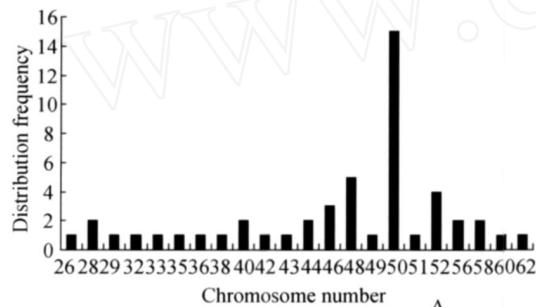


图 5 RMF 的染色体条数分布及染色体形态

Fig. 5 The frequency distribution of chromosomes of RMF treated with colchicines and phase-contrast photomicrograph of these three new established cells cellular chromosomes arrested in metaphase 放大倍数: 1000 × Magnification: 1000 ×

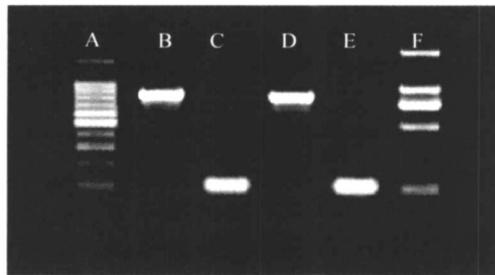


图 6 PCR 产物电泳图

Fig. 6 PCR amplification production

A: 100bp DNA mark; B: Cytb (840bp) (DNA extracted from tissues); C: 18S rRNA (107 bp) (DNA extracted from tissues); D: Cytb (840bp) (DNA extracted from cells); E: 18S rRNA (107 bp) (DNA extracted from cells); F: 250bp DNA mark

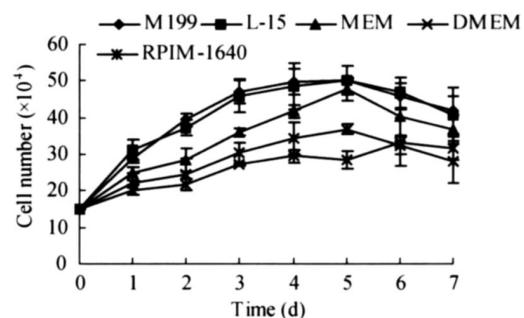


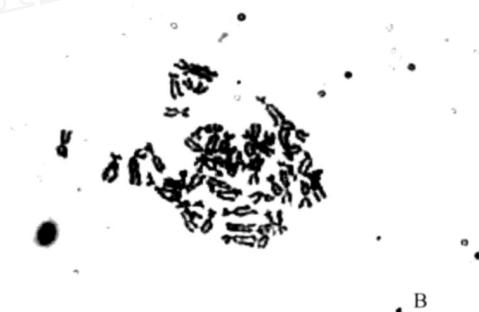
图 4 RMF(20th)细胞系, 25℃下, 对添加 10% FBS 的不同培养液的选择

Fig. 4 Comparative growth of RMF (20th) in selected growth medium supplemented with 10% FBS at 25

2.3 染色体及线粒体基因分析

利用 10^{10} 细胞做染色体分析,计数 50 个细胞的染色体条数, RMF 的染色体条数分布为 26—62 (图 5A), 正常为二倍体细胞的染色体条数为 50 (图 5B)。

对线粒体基因的分析验证 RMF 的种类来源。通过 PCR 扩增 RMF 基因组中的 Cytb 和 18S rRNA 基因, 分别得到 840 bp 和 107 bp 的产物 (图 6)。经过测序分析, 其序列与发表的序列一致。



2.4 重金属对 RMF 细胞的毒性

MTT 法测定结果表明, MTT 的相对还原量 (即细胞存活率) 随重金属浓度的增加而逐渐降低, 并且甲瓒生成量的减少与染毒浓度有依赖关系, 存在良好的剂量—效应关系。根据其回归方程求得 IC_{50} 值, 并比较不同代数细胞系对重金属的毒性敏感性。由图 7 结果显示, 4 种重金属对第 5 代 RMF 毒性的 IC_{50} 值分别为 $(17 \pm 5.1) \mu\text{mol/L}$ (氯化镉)、 $(18 \pm 6.9) \mu\text{mol/L}$ (重铬酸钾)、 $(54 \pm 7.7) \mu\text{mol/L}$ (氯化锌)、 $(137 \pm 24) \mu\text{mol/L}$ (硫酸铜); 4 种重金属对第 20 代 RMF 毒性的 IC_{50} 值分别为 $(23 \pm 4.4) \mu\text{mol/L}$ (氯化镉)、 $(21 \pm 5.9) \mu\text{mol/L}$ (重铬酸钾)、 $(72 \pm 16) \mu\text{mol/L}$ (氯化锌)、 $(163 \pm 19) \mu\text{mol/L}$ (硫酸铜)。随着 RMF 传代数的增加, 虽然对 4 种重金属毒性的敏感性均为下降趋势, 但经统计分析发现, 20 代之内

没有显著性差异。

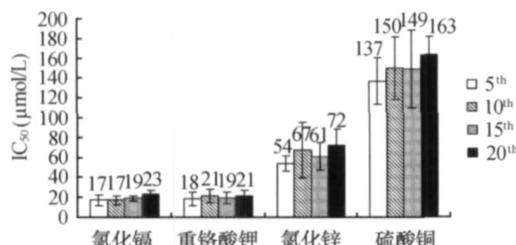


图 7 四种重金属对不同代数 RMF 细胞系的毒性比较

Fig. 7 Comparison of the cytotoxicity of four heavy metals on different passages of RMF cell line

3 讨 论

3.1 细胞系最适生长条件

Wolf认为,鱼类的体外培养细胞对温度的选择常与鱼类个体的最适生长温度接近:生活在不同纬度的鱼类,其细胞培养的温度各异,温水性鱼类的温度范围是13—37℃,最适生长温度为25℃^[14]。本研究中,稀有𬶋鲫的细胞系可在15—30℃生长,其最适生长温度均为25℃。在15℃时细胞生长增殖缓慢,在30℃时,细胞增殖旺盛,但由于温度过高,细胞易衰退。本研究中,新建细胞系RMF能在添加10%以上胎牛血清的L-15或M199培养液中生长,这两种培养液也是鱼类细胞培养常用的培养液^[15—20]。

3.2 细胞系同源性鉴定

在对RMF细胞系的种类来源鉴定中,我们发现RMF细胞系的染色体条数都存在缺失和增多现象。Wharton, *et al.*^[21]认为所有的动物细胞系中,在获得无限期培养的潜能力时,总是伴随染色体组型异倍化的趋势,并随着传代次数的增加而异倍化的比例增大。Lu, *et al.*^[22]认为在长期离体培养的条件下,由于可见光、温度、pH值、培养基等的变化,可能引起细胞的变异和提高细胞的突变率,因此,经过离体培养的细胞,染色体数目的变异是存在的。由此可见,培养细胞转化的过程是细胞不断适应人工环境,不断变异的过程,这为绝大多数的稳定细胞系染色体出现部分异倍化提供了实验的证据。虽然细胞的染色体存在缺失和增多现象,但RMF的染色体主要分布条数为50条,与稀有𬶋鲫的染色体条数一致^[23]。

尽管我们通过染色体鉴定了新建细胞系的同源性,为了进一步鉴定其种类来源,我们提取其早期培养细胞(第8代)的基因组DNA通过PCR扩增了18S rRNA和Cytb的基因片段,经过测序发现, RMF细胞的18S rRNA和Cytb基因片段与已经发表的EF190321和AF375865碱基序列完全一致。

3.3 细胞系检测重金属的毒性

本研究比较了RMF的5th、10th、15th、20th细胞对4种重金属毒性的敏感性,结果表明, RMF对四种重金属毒性的敏感性均表现出随着传代代数的增大而下降的趋势,但20代之内未发现显著性差异($p > 0.05$)。有报道称,同一鱼类的原代培养细胞较之传代细胞对毒物的毒性更加敏感^[8, 24],可能

其原因是原代培养细胞较永生性细胞系作为毒物毒性的检测体系,其细胞的形态和生理条件等与体内细胞形态、生理条件等相关性更大一些^[25, 26]。在本实验中,20代之内未见显著性变化,可能是传代代数还未达到出现显著性变化的细胞状态,但比较这4种重金属对草鱼鳍条组织细胞系GCF(72代)的毒性^[27]发现,这4种重金属对GCF(72th)的IC₅₀值分别为(18±0.6)μmol/L(氯化镉)、(13±2.2)μmol/L(重铬酸钾)、(150±47)μmol/L(氯化锌)、(146±90)μmol/L(硫酸铜),在5thRMF细胞检测出的某些重金属毒性(氯化镉、氯化锌、硫酸铜)IC₅₀值小于72thGCF细胞系的检测值,在20th时的RMF细胞检测出的某些重金属(氯化镉、重铬酸钾、硫酸铜)IC₅₀值大于GCF72th细胞的检测值,可见RMF细胞的培养早期对重金属的直接作用反应是相对敏感的。早期RMF是否考虑作为体外毒性检测的实验材料之一,有待于进一步探讨。

致谢:

感谢中国科学院水生生物研究所徐盈课题组在实验材料等方面的帮助。

参考文献:

- [1] Wang J W. Reproductive biology of *Gobiocypris rarus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1992, 16(2): 165—174 [王剑伟.稀有𬶋鲫的繁殖生物学.水生生物学报,1992,16(2):165—174]
- [2] Wang J W. Acute effects of high concentration of dissolved free carbon dioxide and low dissolved oxygen in rare minnow [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1995, 19(1): 84—88 [王剑伟.稀有𬶋鲫对高浓度二氧化碳和低溶氧的急性反应.水生生物学报,1995,19(1):84—88]
- [3] Wang J W. Study on the critical temperature of rare minnow [J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 1996, 15(4): 153—155 [王剑伟.稀有𬶋鲫临界温度的研究.四川动物,1996,15(4):153—155]
- [4] Boume E W, Jones R W. Effects of 7, 2-dimethylbenz(A)anthracene (DMBA) in fish cells *in vitro* [J]. *Transactions of the American Microscopical Society*, 1973, 92(1): 140—2
- [5] Castaño A, Gomez-Lechon M J. Comparison of basal cytotoxicity data between mammalian and fish cell lines: a literature survey [J]. *Toxicology in Vitro*, 2005, 19: 695—705
- [6] Fent K. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: A assessment of cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples [J]. *Toxicology in Vitro*, 2001, 15: 477—488
- [7] Araujo C S, Marques S A, Carrondo M J, *et al.* *In vitro* response of the brown bullhead catfish (BB) and rainbow trout (RTG-2) cell line to benzo[*a*]pyrene [J]. *Science of the Total Environment*, 2000, 247(2—3): 127—135
- [8] NíShíleabhaín S, Mothersill C, Sheehan D, *et al.* *In vitro* cytotoxicity testing of three zinc metal salts using established fish cell lines [J]. *Toxicology in Vitro*, 2004, 18: 365—376
- [9] Davoren M, NíShíleabhaín S, Hartl M G J, *et al.* Assessing the potential of fish cell lines as tools for the cytotoxicity testing of

- estuarine sediment aqueous elutriates [J]. *Toxicology in Vitro*, 2005, **19**: 421—431
- [10] Sánchez P, Llorente M T, Castaño A. Flow cytometric detection of micronuclei and cell cycle alterations in fish-derived cells after exposure to three model genotoxic agents: mitomycin C, vincristine sulfate and benzo()pyrene [J]. *Mutation Research*, 2000, **465**: 113—122
- [11] Kammann U, Rigger J C, Theobald N, et al. Genotoxic potential of marine sediments from the North Sea [J]. *Mutation Research*, 2000, **467**: 161—168
- [12] Kammann U, Bunke M, Steinhart H, et al. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay [J]. *Mutation Research*, 2001, **498**: 67—77
- [13] Earley E M. Chromosome preparations from monolayer cell cultures [J]. *TCA Manual*, 1975, **1**: 31—35
- [14] Tan F X, Wang M, Wang W M. Optimization of MTT assay for the determination of cytotoxicity of Cd²⁺ and Cr⁶⁺ in kidney cell line of grass carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30** (3): 371—374 [谭凤霞,王敏,王卫民.利用草鱼CK细胞和MTT法测定镉和铬毒性试验的优化.水生生物学报,2006,30(3):371—374]
- [15] Hong X J, Wang M Q. Establishment and biological characteristics of a new fish cell line (SME-) from southern catfish (*Silurus meriaeionalis* Chen) [J]. *Journal of Southwest Agricultural University*, 1995, **17**(5): 419—422 [洪锡钧,王明权.南方鮰SME-细胞系的建立及其生物学特性的研究.西南农业大学学报,1995,17(5):419—422]
- [16] Lakra W S, Bhonde R R, Sivakumar N, et al. A new fibroblast like cell line from the fry of golden mahseer *Tor putitora* (Ham) [J]. *Aquaculture*, 2006, **253**: 238—243
- [17] Qin Q W, Wu T H, Jia T L, et al. Development and characterization of a new tropical marine fish cell line from grouper, *Epinephelus coioides* susceptible to iridovirus and nodavirus [J]. *Journal of Virological Methods*, 2006, **131**: 58—64
- [18] Parameswaran V, Shukla R, Bhonde R, et al. Establishment of embryonic cell line from sea bass (*Lates calcarifer*) for virus isolation [J]. *Journal of Virological Methods*, 2006a, **137**: 309—316
- [19] Parameswaran V, Shukla R, Bhonde R R, et al. Splenic cell line from sea bass, *Lates calcarifer*. Establishment and characterization [J]. *Aquaculture*, 2006b, **261**: 43—53
- [20] Sahul Hameed A S, Parameswaran V, Shukla R, et al. Establishment and characterization of India's first marine fish cell line (SISK) from the kidney of sea bass (*Lates calcarifer*) [J]. *Aquaculture*, 2006, **257**: 92—103
- [21] Wharton J H, Ellender R D, Middlebrow B L, et al. Fish cell culture: Characteristics of a cell line from the Silver Perch, *Bairdiella Thysani* [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 1977, **13**(6): 389—397
- [22] Lu Y, Lannan C, Roveck J, et al. Fish cell lines: Establishment and characterization of three new cell lines from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 1990, **26**: 275—279
- [23] Jia F J, Wei Y. A preliminary study of the karyotype of *Gobiocarpis nana* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **25**(4): 425—426 [贾方钧,魏芸.稀有^鈎鲫的染色体核型初报.水生生物学报,2001,25(4):425—426]
- [24] NíShiúleabhaín S, Mothersill C, Sheehan D, et al. Cellular responses in primary epidermal cultures from rainbow trout exposed to zinc chloride [J]. *Ecotoxicological Environmental Safety*, 2006, **65**: 332—341
- [25] Mothersill C, Lyng F, Lyons M, et al. Growth and differentiation of epidermal cells from the rainbow trout established as explants and maintained in various media [J]. *Journal of Fish Biology*, 1995, **46**: 1011—1025
- [26] Lyons A, Cantara M, Mooney R, Lyng F, et al. The effects of cadmium exposure on the cytology and function of primary cultures from rainbow trout [J]. *Cell Biology and Function*, 1998, **16**: 1—13
- [27] Tan F X, Wang M, Wang W M, et al. Comparative evaluative cytotoxicity of six fish cell lines to four heavy metals [J]. *Toxicology in Vitro*, 2008, **22**(1): 164—170