

16+

ISSN 2078-1008

ТРОМБОЗ ГЕМОСТАЗ И РЕОЛОГИЯ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ



EMLTD

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN LEAGUE
AGAINST THROMBOTIC DISEASES IS ASSOCIATED
WITH RUSSIAN NATIONAL ASSOCIATION
ON THROMBOSIS AND HEMOSTASIS

№ 1
2017



www.hemostas.ru

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРА XIII НА УСТОЙЧИВОСТЬ ФИБРИНОВЫХ СГУСТКОВ К ЛИЗИСУ *IN VITRO* В УСЛОВИЯХ ИНТЕНСИВНОЙ ГЕМОДИНАМИКИ

Д.А. Ивлев^{1,2}, Ш.Н. Джумаева^{1,2}, К.Г. Гурия¹, С.Г. Узлова², Г.Т. Гурия^{1,2}

ФГБОУ ВПО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», Долгопрудный¹; ФГБУ «Гематологический научный центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва²; Россия

Эффективность фибринолитической терапии лимитируется действием фактора XIII (FXIII) в крови. Настоящая работа посвящена изучению роли FXIII в обеспечении устойчивости тромбов к действию литических агентов в условиях потока. Было показано, что эффективность фибринолиза в значительной степени зависит от стадии развития процессов свертывания к моменту инъекции фибринолитика. Если фибринолитик вводился спустя несколько минут после регистрации первичных микросгустков, эффективность фибринолиза оказывалась значительно ниже. Эксперименты показали, что как в случае своевременного, так и в случае задержанного введения, эффективность фибринолиза в присутствии ингибитора FXIII возрастала. Полученные результаты свидетельствуют о том, что FXIII значительно повышает устойчивость фибриновых сгустков к фибринолизу уже в первые минуты их формирования.

Ключевые слова: интенсивный поток — тромбы — фактор XIII — фибринолиз — фибрин — устойчивость — ультразвук — Доплер.

FACTOR XIII INFLUENCES UPON FIBRIN CLOT STABILITY RESISTING *IN VITRO* LYSIS UNDER CONDITIONS OF INTENSIVE HEMODYNAMICS

D.A. Ivlev^{1,2}, Sh.N. Dzhumaeva^{1,2}, K.G. Guriya¹, S.G. Uzlova², G.T. Guriya^{1,2}

Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny¹;
National Research Center for Hematology, Health Ministry of Russian Federation², Moscow; Russia

The effectiveness of fibrinolytic therapy is limited by blood factor XIII (FXIII) influence. In present work we investigated the FXIII role in providing of clots resistance to fibrinolytic agents under flow conditions. It was shown that effectiveness of fibrinolysis was greatly depended on clot formation stage by the time of fibrinolytic injection. If fibrinolytic agent was injected a few minutes after primary microclots detection, the effectiveness of fibrinolysis significantly decreased. The experiments showed that as in case of timely and as well as in case of delayed injection, the effectiveness of fibrinolysis increased in presence of FXIII inhibitor. Obtained results demonstrate that FXIII significantly increases fibrin clot resistance to fibrinolysis within the first minutes of their formation.

Key words: intensive flow — thrombi — factor XIII — fibrinolysis — fibrin — resistance — ultrasonic — Doppler.

ВВЕДЕНИЕ

Как известно, устойчивость фибриновых сгустков, сформированных в крови, к лизису обеспечивается фибринстабилизирующим фактором — фактором XIII (FXIII) системы свертывания крови [1, 2]. Этот белок играет важную физиологическую роль: его недостаток может привести к массивным кровотечениям, нарушению процесса заживления ран, геморрагическим абсцессам и другим серьезным осложнениям [3–6].

Фибринолитическая терапия играет важную роль в борьбе с тромботическими осложнениями. Эффективность фибринолитической терапии лимитируется действием FXIII в крови [7]. В последние годы были разработаны новые препараты для активации плазминогена и значительно усовершенствованы клинические протоколы их введения [8–10]. При этом устоявшееся представление о том, что чем больше «клинический» возраст тромба, тем хуже он поддается лизису, не было пересмотрено [11–13].

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ

Ивлев Дмитрий Андреевич — аспирант кафедры физики живых систем ФГБОУ ВПО «МФТИ (ГУ)».

Адрес: 141701, Россия, Московская область, Долгопрудный, Институтский переулок, д.9.

E-mail: ivlevda@gmail.com

Статья поступила 4.10.2016, принята к печати 27.01.2017.

Современные представления о биохимических механизмах действия FXIII в качестве стабилизатора фибриновых сгустков подробно описаны [2, 14, 15]. Гемодинамические аспекты действия FXIII на формирование фибриновых сгустков, влияющие на их устойчивость к лизису, обсуждаются лишь в отдельных работах [16, 17]. При этом существующие подходы подразумевают формирование фибриновых сгустков в потоках крови, а исследование их лизиса — в условиях стаза. Однако, насколько нам известно, до настоящей работы не изучался вопрос о том, как сформированные в кровотоке сгустки подвергаются лизису в условиях интенсивной гемодинамики.

В настоящей работе фибринолиз в потоках крови изучался *in vitro* с помощью ультразвукового доплеровского метода. Ранее было показано, что данный метод позволяет надежно детектировать начало свертывания крови в условиях интенсивного кровотока [18, 19].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Физиологические жидкости

В экспериментах использовалась свежезамороженная плазма крови, предоставленная научно-клиническим отделом процессинга клеток крови и криоконсервирования ФГБУ ГНЦ МЗ РФ. Кровь отбирали у здоровых доноров в полиэтиленовые контейнеры Imuflex®, содержащие раствор гемоконсерванта CPD. Плазма выделялась из цельной крови центрифугированием (центрифуга Sorvall RC3BP+) в течение 17 минут при 3600 оборотов в минуту, после чего подвергалась процедуре заморозки до -30°C в течение 30 минут. Плазма размораживалась на водяной бане при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ непосредственно перед началом каждой серии экспериментов.

Фибринолитические препараты

Для активации фибринолитической системы использовались фармакологические препараты трех основных типов: стрептокиназа (РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь), тканевый активатор плазминогена rt-PA («Актилизе», Boehringer Ingelheim International, Германия) и урокиназа («Урокиназа Медак», Medac GmbH, Германия).

Все 3 препарата были в виде лиофилизата. Раствор стрептокиназы в течение серии хранился в холодильнике при $+4^{\circ}\text{C}$. Урокиназа и тканевый активатор плазминогена хранились в виде замороженных при -40°C аликвот, которые размораживались непосредственно перед каждым экспериментом. Во всех опытах объем вводимого раствора фибринолитика оставался неизменным — 0,5 мл.

Ингибиторы фактора XIII системы свертывания крови

Для исследования роли FXIII в формировании устойчивых к действию литических агентов фибриновых сгустков использовались ингибиторы FXIIIa: неспецифический — йодоацетамид (IAN, Sigma-Aldrich, Германия) и специфический — 1,3,4,5-Tetramethyl-2-[(2-oxopropyl)thio]imidazolium chloride (T101, ZEDIRA GmbH, Германия).

Экспериментальная установка

Схема экспериментальной установки представлена на рисунке 1. Использовалась замкнутая система гемосовместимых трубок производства компании MEDSIL (Россия) с внутренним диаметром 4 мм. Объем такой замкнутой системы составлял 18 мл. Перед началом каждого эксперимента система заполнялась плазмой крови. Жидкость в трубке приводи-

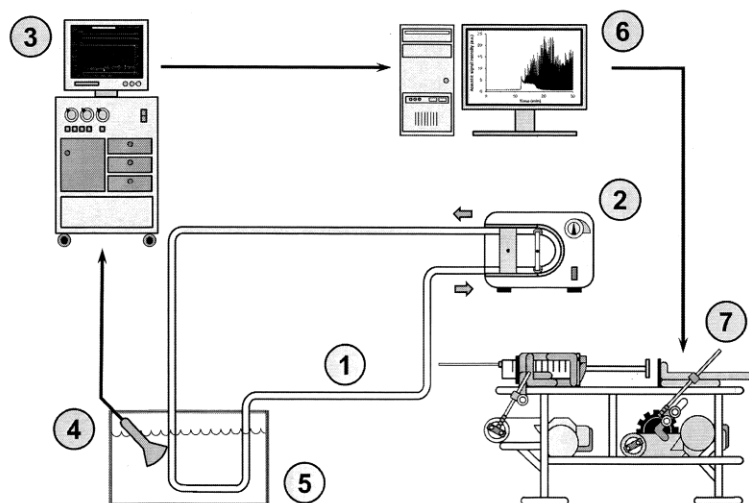


Рис. 1. Схема экспериментальной установки: 1 — замкнутая система силиконовых трубок; 2 — перистальтический насос; 3 — ультразвуковой сканер; 4 — ультразвуковой датчик; 5 — ванна с водой; 6 — компьютер, осуществляющий запись и обработку данных; 7 — автоматический инжектор.

лась в движение перистальтическим насосом Efran peristaltic pump, type 372.1 (Польша). Средний объемный кровоток в системе составлял 3,5 мл/сек. Для активации системы свертывания в плазму крови вводился 10% раствор кальция хлорида (500–700 мкл).

Для регистрации процессов свертывания и фибринолиза использовался ультразвуковой сканер Vingmed SD50 (Норвегия) с датчиком, работающим на частоте 5 МГц. Сканер работал в доплеровском режиме. Данные регистрации записывались на персональный компьютер.

Введение фибринолитических препаратов в поток плазмы осуществлялось автоматическим инжектором, собранным на базе конструктора LEGO Mindstorm NXT 2.0 (Дания) и позволявшим осуществлять введение фибринолитика воспроизводимым образом по команде компьютера. Фибринолитик вводился в систему равномерно в течение 10 секунд. При помощи специального программного обеспечения производился анализ акустического сигнала в режиме реального времени. В результате автоматической обработки данных акустической регистрации компьютер давал инжектору команду на срабатывание.

Обработка сигнала

Входной сигнал, поступающий на компьютер, представлял собой доплеровский сдвиг частоты при отражении ультразвука от движущихся частиц в потоке. При этом амплитуда сигнала зависела от количества и размера отражающих элементов (фибриновых сгустков) в потоке, пролетавших перед датчиком. Сигнал оцифровывался в формате 44100 Гц, 16 бит. Далее сигнал подвергался фильтрации полосовым фильтром Баттерворта 2-го порядка с полосой пропускания 200–1600 Гц [20].

Модуль амплитуды акустического сигнала усреднялся с периодичностью 1 раз в секунду во временном окне протяженностью 2 секунды. Эта величина называлась средним модулем амплитуды акустического сигнала (СМА). Зависимость СМА от времени использовалась для оценки кинетики развития фибринолитических процессов.

В течение первых двух минут после введения 10% раствора кальция хлорида в каждом эксперименте рассчитывался базовый уровень СМА. Пороговое значение СМА задавалось превосходящим базовый уровень сигнала в 2 раза. Превышение порогового значения СМА служило индикатором начала процессов тромбообразования в системе; в результате инжектор получал команду с компьютера на срабатывание. В экспериментах с задержкой введения фибринолитика инжектор срабатывал не сразу, а по истечении заранее задаваемого промежутка времени после

получения сигнала о начале свертывания в экспериментальной системе.

Оценка эффективности фибринолиза

Для количественной оценки эффективности фибринолиза вычислялась интегральная характеристика, называемая в дальнейшем индексом эффективности фибринолиза (ИЭФ). Значение ИЭФ рассчитывалось на основании данных акустической регистрации, полученных в ходе экспериментальной серии.

Значение ИЭФ рассчитывалось по формуле: $ИЭФ = 1 - S/S_0$, где S обозначает площадь между верхней и нижней огибающими на графике зависимости СМА от времени, а S_0 соответствует площади, рассчитанной для контрольного опыта (без активации фибринолиза). Если не оговаривалось иное, для вычисления ИЭФ в настоящей работе использовался участок графика, соответствующий 60 минутам после превышения СМА порогового значения.

Величина S отображает интегральную интенсивность акустического сигнала, отраженного от макроскопических сгустков в системе за время эксперимента. В частности, это значит, что чем быстрее процесс лизиса сгустков, тем меньше величина S . Из формулы видно, что в случаях быстрого и эффективного фибринолиза значение ИЭФ стремится к единице, а в случаях полного отсутствия фибринолиза — к нулю.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Устойчивость фибриновых сгустков к лизису на различных стадиях свертывания

Характерный вид экспериментально регистрируемых временных зависимостей СМА в опытах с различными временами задержки введения фибринолитика представлен на **рисунке 2**. Верхняя огибающая графика определяется регистрацией крупных сгустков, пролетающих перед ультразвуковым датчиком, а нижняя — мелких сгустков, формирующих фоновой уровень.

Эксперименты показали, что фибринолитический эффект от использованных препаратов существенно зависел от того, на какой фазе процессов свертывания осуществлялось их введение. Видно, что введение фибринолитиков сразу же после регистрации начала процессов свертывания в системе ведет к быстрому и полному растворению сгустков (**рис. 2Б**). Процесс растворения сгустков проявляется в виде постепенного уменьшения осцилляций СМА и возвращению величины СМА к исходному уровню.

Как видно из графиков (**рис. 2В, 2Г, 2Д, 2Е**), при введении в систему фибринолитика с задержкой

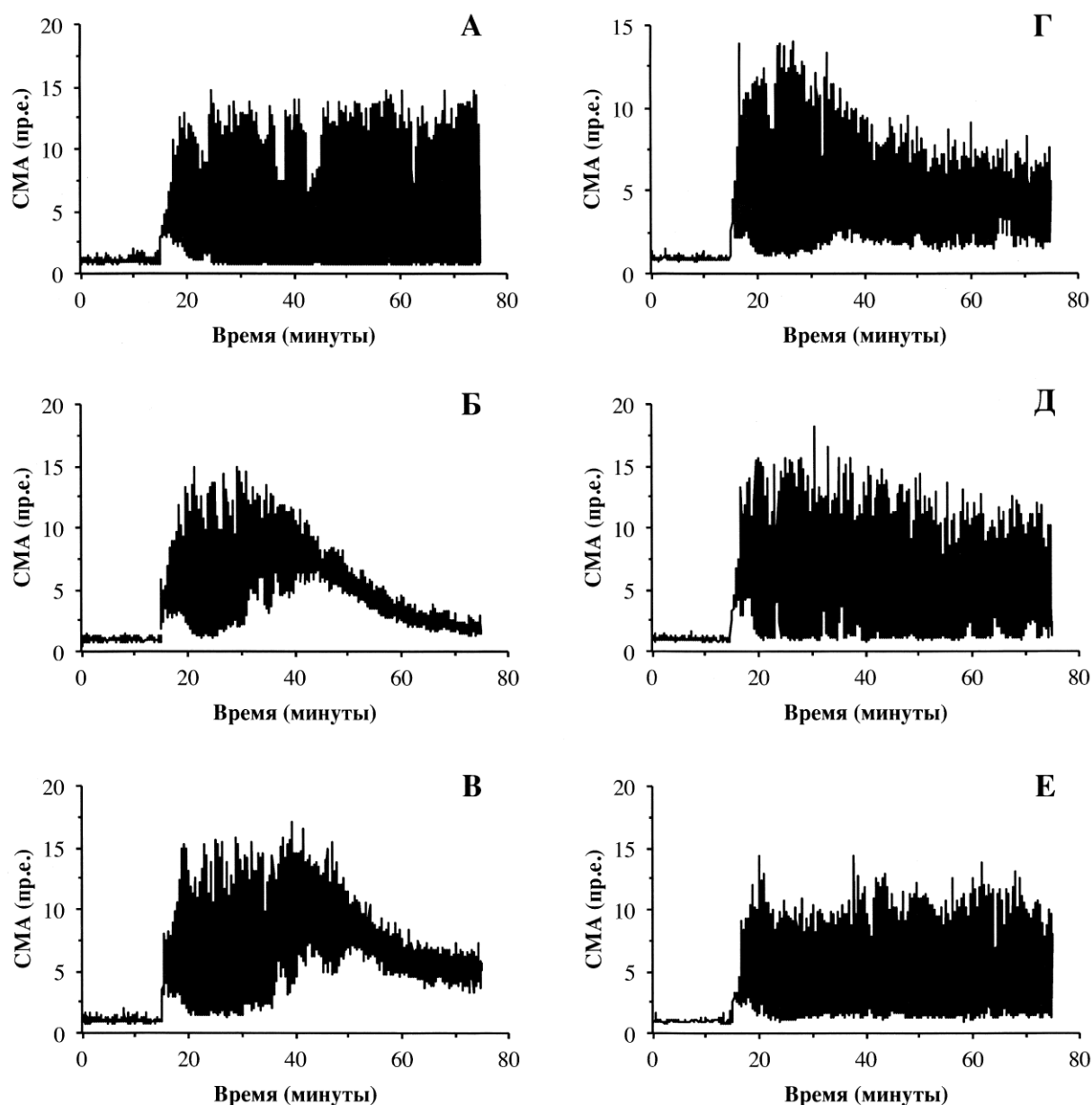


Рис. 2. Характерный вид зависимостей среднего модуля амплитуды акустического сигнала (СМА) от времени в опытах с различными временами задержки введения урокиназы в дозировке 500 МЕ/мл: **А** — опыт без активации фибринолитической системы; **Б** — опыт с введением урокиназы сразу после регистрации свертывания; **В, Г, Д, Е** — опыт с введением урокиназы с задержкой 30, 90, 180 и 300 секунд, соответственно.

кинетика развития процессов фибринолиза замедляется. В экспериментах, в которых фибринолитик вводился в систему через 5 минут после регистрации начала свертывания (**рис. 2Е**), график зависимости СМА от времени практически не отличался от графика, полученного в опыте без активации фибринолиза (**рис. 2А**). В этих случаях за время эксперимента (60 минут после начала свертывания) существенного лизиса фибриновых сгустков зарегистрировано не было.

Тенденция понижения эффективности фибринолиза при увеличении задержки введения литических агентов отчетливо видна на графике зависимости ИЭФ от времени задержки (**рис. 3**), построенном по результатам 5 экспериментальных серий с введением одинаковой дозировки урокиназы с задержкой в 30, 60, 90, 120, 180 и 300 секунд. Представленные на **рисунке 3** результаты показывают, что уже в первые 5 минут после начала свертывания в систе-

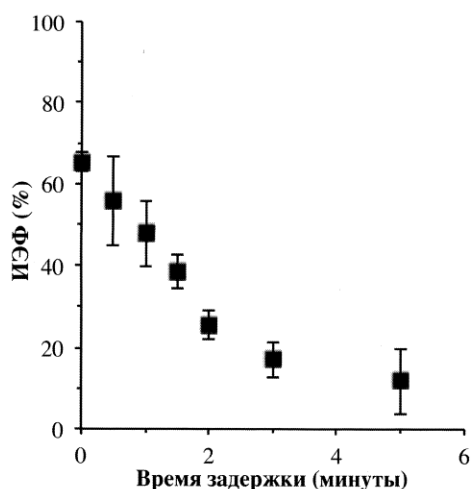


Рис. 3. Зависимость индекса эффективности фибринолиза (ИЭФ) от времени задержки введения урокиназы в дозировке 500 МЕ/мл.

ме образуются сгустки, обладающие значительной устойчивостью к лизису.

Понижение эффективности фибринолитических процессов при увеличении задержки введения фибринолитика наблюдалось также в опытах с использованием стрептокиназы и тканевого активатора плазминогена.

Влияние ингибиторов фактора XIII системы свертывания крови на обеспечение устойчивости к лизису фибриновых сгустков

Для проверки того, насколько FXIII влияет на формирование устойчивости сгустков к фибринолизу, были проведены эксперименты с ингибированием активного FXIII. Было обнаружено, что в опытах с заблаговремен-

ным введением ингибитора FXIII процессы фибринолиза развивались эффективнее. На **рисунке 4** представлены фотографии чашек Петри с фибриновыми сгустками, извлеченными из экспериментальных систем через 1 час после регистрации начала процессов свертывания. В экспериментах с предварительным введением ингибитора FXIII в плазму к концу опыта не наблюдалось крупных фибриновых сгустков (**рис. 4В**). В контрольных экспериментах, в которых вместо ингибитора FXIII был введен физиологический раствор, полного фибринолиза не происходило (**рис. 4Б**).

Повышение эффективности фибринолиза с ростом концентрации йодоацетамида в опытах с введением урокиназы показано на **рисунке 5**. Зависимость СМА от времени, полученная в одном из опытов этой же экспериментальной серии, представлена на **рисунке 5Б**. Приведенные данные свидетельствуют в пользу того, что FXIII системы свертывания крови вносит вклад в устойчивость фибриновых сгустков к фибринолизу уже в первые минуты свертывания.

При ингибировании FXIII специфическим ингибитором T101 наблюдался эффект, аналогичный полученному в опытах с неспецифическим ингибитором йодоацетамидом. В присутствии T101 удавалось добиться полного лизиса сгустков за 1 час эксперимента (даже при задержанном на 300 секунд введении фибринолитика). На **рисунке 6** представлено изменение индекса эффективности фибринолиза для серии экспериментов со специфическим ингибитором FXIII — T101.

ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперименты с ингибиторами FXIII, проведенные в настоящей работе, показали, что устойчивость

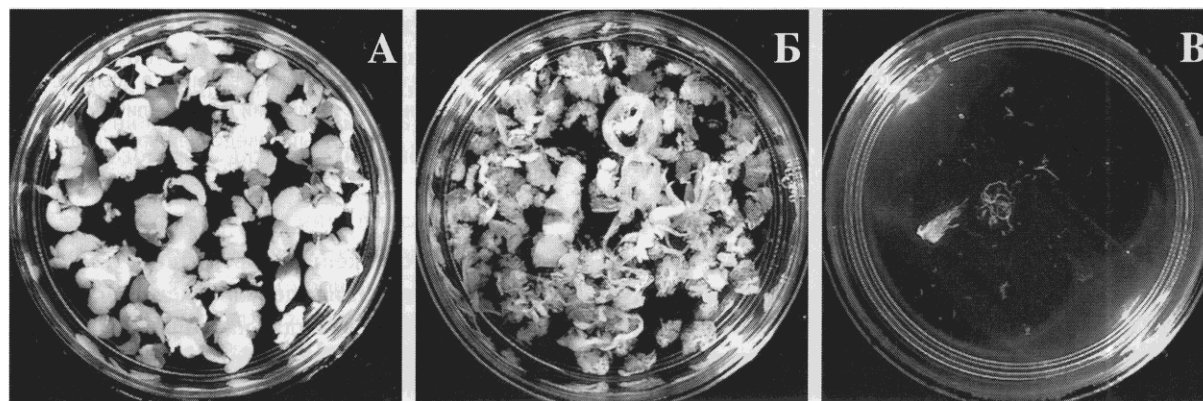


Рис. 4. Фотографии чашек Петри с фибриновыми сгустками, извлеченными из экспериментальных систем через 1 час после регистрации начала процессов свертывания: **А** — опыт без активации фибринолитической системы; **Б** — фибринолиз, вызванный введением rt-PA (0,025 мг/мл) с задержкой 5 минут после регистрации свертывания; **В** — фибринолиз, вызванный введением rt-PA (0,025 мг/мл) с задержкой 5 минут после регистрации свертывания, при наличии в системе ингибитора фактора XIII — йодоацетамида в концентрации 7,5 мМ.

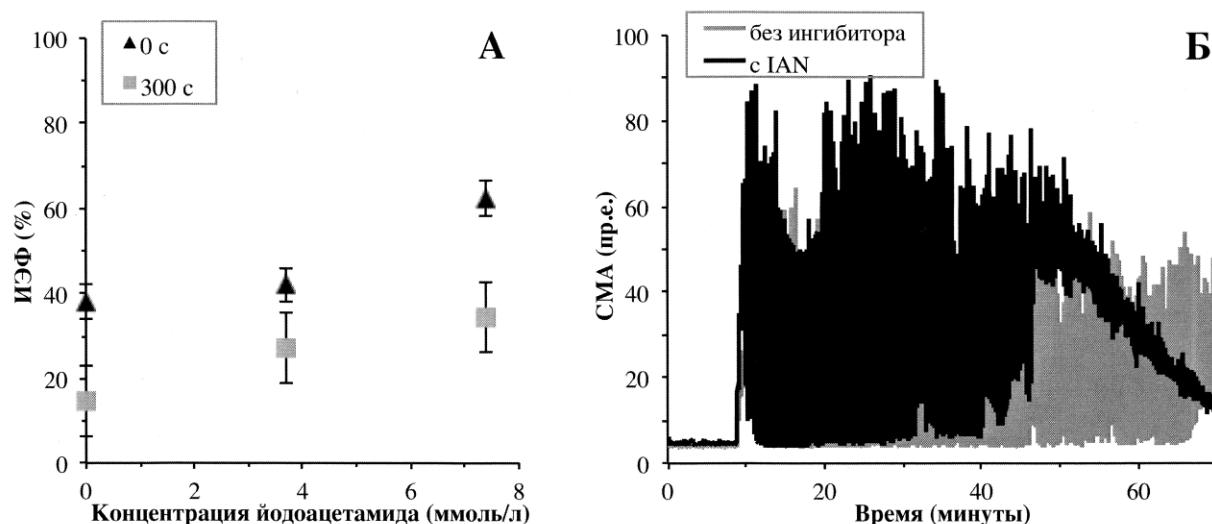


Рис. 5. Влияние йодоацетамида (IAN) на устойчивость фибриновых сгустков к действию фибринолитического препарата урокиназы в дозировке 500 МЕ/мл: **А** — зависимость индекса эффективности фибринолиза (ИЭФ) от дозировки IAN при введении урокиназы через 0 секунд и 300 секунд после регистрации свертывания в системе; **Б** — сравнение зависимостей среднего модуля амплитуды акустического сигнала (СМА) от времени в экспериментах с предварительным введением в систему физраствора и раствора IAN в концентрации 7,4 мМ (введение урокиназы осуществлялось через 300 секунд после регистрации свертывания).

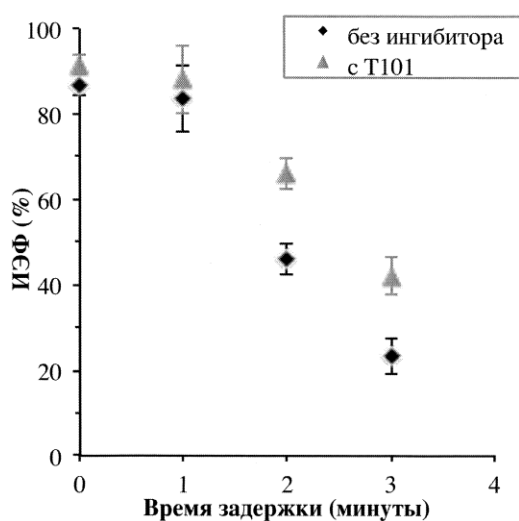


Рис. 6. Зависимости индекса эффективности фибринолиза (ИЭФ) от величины задержки введения фибринолитика в опытах с ингибитором FXIII — T101 (0,01 мМ) и без него. Экспериментальная серия с тканевым активатором плазминогена rt-PA (0,025 мг/мл).

фибриновых сгустков к лизису в потоках крови за счет действия активированного фактора FXIII (FXIIIa) формируется, начиная уже с первых минут свертывания. По существующим представлениям, FXIIIa обеспечивает устойчивость фибриновых сгустков к лизису, сшивая между собой γ - и α -цепи молекул фибрина, а также связывая α_2 -антиплазмин, мощный ингибитор плазмينا, с молекулами фибрина [2, 14, 15].

По-видимому, наблюдаемый нами эффект может быть объяснен быстрым связыванием α_2 -антиплазмينا с фибрином, которое происходит уже в первые минуты активации FXIII [21, 22].

В настоящей работе были использованы концентрации фибринолитиков, близкие к применяемым в клинической практике. Повышение эффективности фибринолиза в опытах с ингибированием FXIII может служить предпосылкой для разработки новых превентивных протоколов коррекции гемостаза у пациентов, подверженных риску тромботических осложнений. Ингибирование FXIII в принципе способно расширить временной интервал для проведения эффективных фибринолитических процедур, тем самым открывая новые возможности для успешного тромболитика.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе фибринолиз в потоках крови изучался *in vitro* с помощью ультразвукового доплеровского метода. Ранее было показано, что данный метод позволяет надежно детектировать начало свертывания крови в условиях интенсивного кровотока [18, 19].

В рамках настоящей работы удалось развить этот метод и с его помощью установить, что:

1) эффективность фибринолиза существенно зависит от того, на какой из стадий свертывания крови производится инъекция фибринолитика;

2) устойчивость фибриновых сгустков к действию литических агентов стремительно возрастает уже в первые минуты их формирования;

3) заблаговременное введение ингибиторов FXIII в плазму крови (до начала процессов свертывания) снижает устойчивость формирующихся впоследствии фибриновых сгустков к действию литических агентов в потоке.

Заблаговременное введение ингибиторов FXIII расширяет окно возможностей для проведения эффективного фибринолиза. Введение литических агентов даже со значительной задержкой было способно вызвать полное растворение фибриновых сгустков. Развитие новых подходов, основанных на полученных в работе результатах, может представлять интерес для клиницистов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузник Б. И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии: монография. — Чита: Экспресс-издательство, 2010. — 832 с.
2. Muszbek L., Bereczky Z., Bagoly Z. et al. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions // *Physiol. Rev.* — 2011. — Vol. 91, № 3. — P. 931–972.
3. Anwar R., Miloszewski K. J. A. Factor XIII deficiency // *Br. J. Haematol.* — 1999. — Vol. 107, № 3. — P. 468–484.
4. Kohler H. P., Ichinose A., Seitz R. et al. Diagnosis and classification of factor XIII deficiencies // *J. Thromb. Haemost.* — 2011. — Vol. 9, № 7. — P. 1404–1406.
5. Schroeder V., Kohler H. P. New developments in the area of factor XIII // *J. Thromb. Haemost.* — 2013. — Vol. 11, № 2. — P. 234–244.
6. Muszbek L., Katona É. Diagnosis and management of congenital and acquired FXIII deficiencies // *Semin. Thromb. Hemost.* — 2016. — Vol. 42, № 4. — P. 429–439.
7. Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice [Eds. R. W. Colman, J. Hirsh, V. J. Marder, A. W. Clowes, J. N. George]. — Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2006. — 1827 p.
8. Pancioli A. M., Broderick J., Brott T. et al. The combined approach to lysis utilizing eptifibatid and rt-pa in acute ischemic stroke the clear stroke trial // *Stroke.* — 2008. — Vol. 39, № 12. — P. 3268–3276.
9. Weitz J. I., Eikelboom J. W., Samama M. M. New antithrombotic drugs: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines // *Chest.* — 2012. — Vol. 141, № 2 (Suppl). — e120S–e151S.
10. Chapin J. C., Hajjar K. A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation // *Blood. Rev.* — 2015. — Vol. 29, № 1. — P. 17–24.
11. Балуда В. П., Балуда М. В., Деянов И. И., Тлепшук И. К. Физиология системы гемостаза. — М.: МИА, 1995. — 250 с.
12. Meretoja A., Keshtkaran M., Saver J. L. et al. Stroke thrombolysis save a minute, save a day // *Stroke.* — 2014. — Vol. 45, № 4. — P. 1053–1058.
13. Campbell B. C. V., Meretoja A., Donnan G. A., Davis S. M. Twenty-year history of the evolution of stroke thrombolysis with intravenous alteplase to reduce long-term disability // *Stroke.* — 2015. — Vol. 46, № 8. — P. 2341–2346.
14. Bagoly Z., Koncz Z., Hársfalvi J., Muszbek L. Factor XIII, clot structure, thrombosis // *Thromb. Res.* — 2012. — Vol. 129, № 3. — P. 382–387.
15. Katona É., Péntzes K., Csapó A. et al. Interaction of factor XIII subunits // *Blood.* — 2014. — Vol. 123, № 11. — P. 1757–1763.
16. Hethershaw E. L., Cilia La Corte A. L., Duval C. et al. The effect of blood coagulation factor XIII on fibrin clot structure and fibrinolysis // *J. Thromb. Haemost.* — 2014. — Vol. 12, № 2. — P. 197–205.
17. Mutch N. J., Koikkalainen J. S., Fraser S. R. et al. Model thrombi formed under flow reveal the role of factor XIII-mediated cross-linking in resistance to fibrinolysis // *J. Thromb. Haemost.* — 2010. — Vol. 8, № 9. — P. 2017–2024.
18. Узлова С. Г., Гурия К. Г., Шевелев А. А. и др. Акустически детектируемые внутрисосудистые микросгустки как предвестники послеоперационных осложнений // *Бюллетень НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания».* — 2008. — № 6. — С. 55–64.
19. Uzlova S. G., Guria K. G., Guria G. T. Acoustic determination of early stages of intravascular blood coagulation // *Phil. Trans. Roy. Soc. A.* — 2008. — Vol. 366, № 1880. — P. 3649–3661.
20. Smith S. Digital signal processing: a practical guide for engineers and scientists. — Newnes, 2013. — 650 p.
21. Robinson B. R., Hough A. K., Reed G. L. Catalytic life of activated factor XIII in thrombi Implications for fibrinolytic resistance and thrombus aging // *Circulation.* — 2000. — Vol. 102, № 10. — P. 1151–1157.
22. Fraser S. R., Booth N. A., Mutch N. J. The antifibrinolytic function of factor XIII is exclusively expressed through α_2 -antiplasmin cross-linking // *Blood.* — 2011. — Vol. 117, № 23. — P. 6371–6374.

Благодарность. Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (гранты 14-04-01193 и 16-34-01180).