

Ю.З.Гендон

Генетика
вирусов
человека
и
животных

Ю. З. Гендон

57
Г-34

Генетика
вирусов
человека
И
ЖИВОТНЫХ

213070

71

1967

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»

Москва

7 + 575 + 576.8 + 59 + 612

УДК 575.576.858:599.9.59

Предисловие

Генетика вирусов человека и животных

Ю. З. Гендон

Книга содержит обширные сведения об основных современных направлениях в изучении изменчивости вирусов человека и животных, о материальных основах наследственности вирусов, тонкой структуре гена, о молекулярных механизмах мутаций и путях изменения наследственных свойств вирусов. Приводятся данные о методах изучения генетически чистых линий вирусов, подробные и систематизированные сведения о генетических признаках вирусов человека и животных, о методах изменения наследственных свойств этих вирусов. Автор обсуждает взаимоотношения генетических признаков вирусов человека и животных и их отношение к патогенности, возможные пути направленного изменения наследственных свойств этой группы вирусов и ряд других вопросов, имеющих тесное отношение к практической проблеме — получению вакцинных вирусных штаммов.

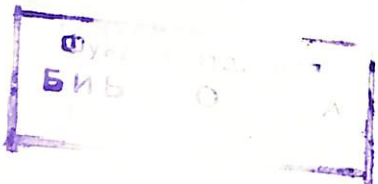
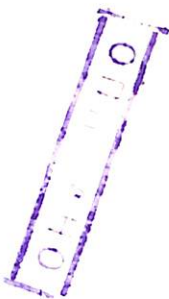
Подобная монография, в которой систематизирована огромная литература по генетике вирусов человека и животных (более 1800 источников работ), публикуется впервые.

Книга рассчитана на научных сотрудников и студентов-генетиков, вирусологов, микробиологов, биохимиков, а также других специалистов в области биологии, медицины и сельского хозяйства, интересующихся вопросами наследственности и изменчивости вирусов человека и животных.

Таблиц 11, рисунков 34, библиограф. 1826.

ПОД РЕДАКЦИЕЙ

ПРОФЕССОРА В. И. ТОВАРНИЦКОГО



2-10-2
452-67(1)

За последнее десятилетие генетика обогатилась рядом весьма важных и интересных открытий. Это обусловлено в основном тем, что объектом генетических исследований стали вирусы — элементарнейшие формы жизни на Земле, обладающие тем не менее такими наиболее существенными признаками всего живого, как размножение, наследственность и изменчивость. Успехи в области открытия новых генетических явлений, добытых наукой на модели вирусов, кроются, с одной стороны, в простоте структуры и химического состава вирусов, а с другой — в несравненной с другими организмами скорости их размножения, сравнительно легко учитываемой изменчивости и резко выраженной способности к генетической рекомбинации. Необходимо подчеркнуть, что вирусные нуклеопротеиды являются пока единственными наследственными структурами, поддающимися мутационным воздействиям различных физических и химических факторов не только *in vivo*, но и *in vitro*.

Хорошо известно, что именно на вирусах было открыто впервые явление внеполового скрещивания, разработана тонкая структура гена, изучены механизмы спонтанных и индуцируемых мутаций и получены основные данные по расшифровке кода белкового синтеза. На вирусах же были установлены единицы генетической рекомбинации и функции, доказана возможность интеграции двух различных геномов (вируса и клетки), раскрыты молекулярные механизмы функциональной активности гена и его передачи из одного организма в другой (явление трансдукции). Следует отметить также, что на вирусах впервые в истории генетики установлены такие важные факты, как сохранение генетической информации не только в ДНК, но и в РНК, и возможность скрещива-

ния на уровне молекул последних. В опытах с вирусами была разработана важная для радиобиологических исследований теория мишени и получены ценные материалы для дальнейших работ в области канцерогенеза. Генетические исследования вирусов привели, как известно, к возникновению новой отрасли знания — молекулярной генетики.

Одновременно с этим приходится констатировать весьма странное явление — отсутствие в научной литературе специальных книг по генетике вирусов человека и животных. Ценные сведения по генетике бактериофагов можно почерпнуть в таких книгах, как Адамс М. «Бактериофаги», 1961 г.; Гольдфарб Д. М. «Бактериофагия», 1961 г.; Дубинин Н. П. «Молекулярная генетика и действие излучений на наследственность», 1963 г.; Сэнджер Р. «Генетика и селекция микроорганизмов», 1964 г.; Райн Ф. «Цитологические и химические основы наследственности», 1964 г.; Хэйс У. «Генетика бактерий и бактериофагов», 1965 г.; Стент Г. «Молекулярная биология вирусов бактерий», 1965 г., и некоторые другие. Однако в перечисленных книгах, как уже отмечалось выше, читатель найдет лишь материалы о генетике фагов, в лучшем случае — 1—2 статьи по генетике вируса табачной мозаики и ни одной — по генетике вирусов человека и животных.

Обширная литература по генетике вирусов животных и человека разбросана по различным периодическим изданиям, что затрудняет ее использование, а сводок и обзоров по этой проблеме почти не имеется. Предлагаемая нашему читателю книга Ю. З. Гендона «Генетика вирусов человека и животных» появляется поэтому вполне своевременно и должна в какой-то мере восполнить этот досадный пробел.

Доктор биол. наук, проф. В. И. Тозарницкий

Генетика — наука, изучающая законы наследственности и изменчивости организмов, в последнее время привлекает к себе большое внимание не только специалистов, работающих в этой области, но и многих ученых, не имеющих непосредственного отношения к этому разделу биологии. Генетика — один из наиболее интересных и важных разделов биологии, в котором скрещиваются интересы биохимиков, биофизиков, вирусологов, генетиков, цитологов и других специалистов. Главной целью генетики является раскрытие законов, лежащих в основе процессов видообразования и эволюции живых существ, узловых законов жизни.

Повышение интереса к генетике объясняется также тем, что в последнее время эта наука обогатилась рядом выдающихся открытий, таких как раскрытие материальных структур, в которых заложена наследственная информация, определение тонкого строения гена, расшифровка генетического кода, выяснение молекулярных механизмов изменчивости и др., которые подняли генетику на новую, более высокую ступень как с методической, так и с методологической точки зрения.

Многими важными открытиями генетика обязана вирусологии, так как вирусы оказались уникальной моделью, используя которую, ученым удалось сделать наиболее выдающиеся открытия, такие, например, как расшифровка генетического кода.

Однако, помимо большого теоретического значения, изучение генетики вирусов представляет также несомненный практический интерес. По сути дела, почти любая проблема, стоящая сейчас перед практической вирусологией — будь то получение штаммов для живых вирусных вакцин и высокоспецифичных антигенов или разработка методов дифференциации вирусных штаммов — тесно связана с генетикой вирусов и зависит от успехов ее развития.

В последние годы опубликовано несколько монографий, посвященных генетике вирусов, в которых обобщаются данные исследований, главным образом, с бактериофагами — той основной

Материальные основы наследственности вирусов

моделью, при использовании которой и были сделаны выдающиеся открытия в области генетики. Однако не меньший интерес представляет изучение генетики другой обширной группы вирусов — вирусов животных и человека. Проведение исследований на этих вирусах важно, во-первых, потому, что полученные результаты могут иметь непосредственное практическое значение, и, кроме того, необходимо учитывать, что частные закономерности, обнаруженные в опытах с бактериофагами, далеко не всегда находят свое подтверждение при исследованиях с вирусами животных и человека.

До настоящего времени не опубликовано пока монографий, в которых были бы подробно систематизированы многочисленные исследования, посвященные генетике вирусов животных и человека. Задача настоящей книги — восполнить этот пробел. Естественно, что в ряде разделов освещаются данные, представляющие общее значение, которые были получены при изучении других групп вирусов. Поскольку эта книга является первой попыткой систематического изложения данных по наследственности и изменчивости вирусов животных и человека, и, естественно, не лишена недостатков, то критические замечания читателей будут приняты автором с благодарностью.

СТРОЕНИЕ И ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ВИРУСОВ

Термином «вирус» до последнего времени определяли зрелый внеклеточный вирус, закончивший все стадии внутриклеточного развития. Именно на этой стадии вирус и подвергался тщательному изучению. Однако сейчас хорошо известно, что вирус проходит сложный цикл внутриклеточной репродукции, в процессе которого образуется ряд специфических белков-ферментов, необходимых для репродукции вируса, но не входящих в состав зрелой вирусной частицы. В связи с этим в последнее время принято зрелый внеклеточный вирус обозначать термином «вирион» [565].

Все вирионы по химическому составу являются нуклеопротеидами, т. е. состоят главным образом из белка и нуклеиновой кислоты. Молекула нуклеиновой кислоты находится внутри вириона и окружена белковой оболочкой (капсидом [1199]). В 1956 г. Крик и Уотсон [610] высказали предположение, что белковая оболочка любых вирионов состоит из отдельных идентичных по составу субъединиц, компактно уложенных и образующих правильную, строго определенную геометрическую форму. Эта гипотеза в последующие годы нашла экспериментальное подтверждение в многочисленных исследованиях [599, 1068]. Количество белковых субъединиц, или как их теперь называют — структурных единиц [565], у различных вирионов оказалось неодинаковым и зави-

сит от размера, формы и симметрии. Структурная единица может быть одной полипептидной цепью или агрегатом идентичных или различных полипептидных цепей. У вирионов с икосаэдрической симметрией структурные единицы могут образовывать группы, носящие название морфологических единиц, или капсомеров [969].

Исследования, проведенные Франклин с сотр. [783], показали, что у палочкообразного вириона вируса табачной мозаики, имеющего спиральную симметрию [969], белковая оболочка состоит из $2130 \pm 2\%$ структурных (белковых) единиц (рис. 1, а).

У вирионов вирусов животных и человека, имеющих меньшие размеры, сферическую форму и кубическую симметрию, общее количество структурных единиц белковой оболочки может быть вычислено по формуле $10(n-1)^2 + 2$, где n — количество структурных единиц на ребре икосаэдра [969]. У вируса полиомелита предполагается наличие 60 структурных единиц, каждая из которых имеет диаметр 60 Å [753] (рис. 1, б); в то же время имеется

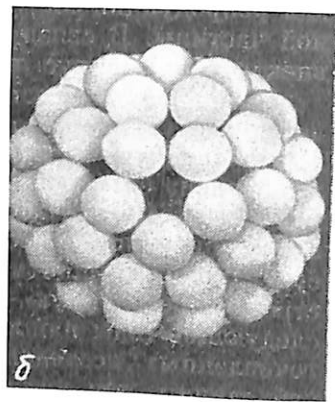
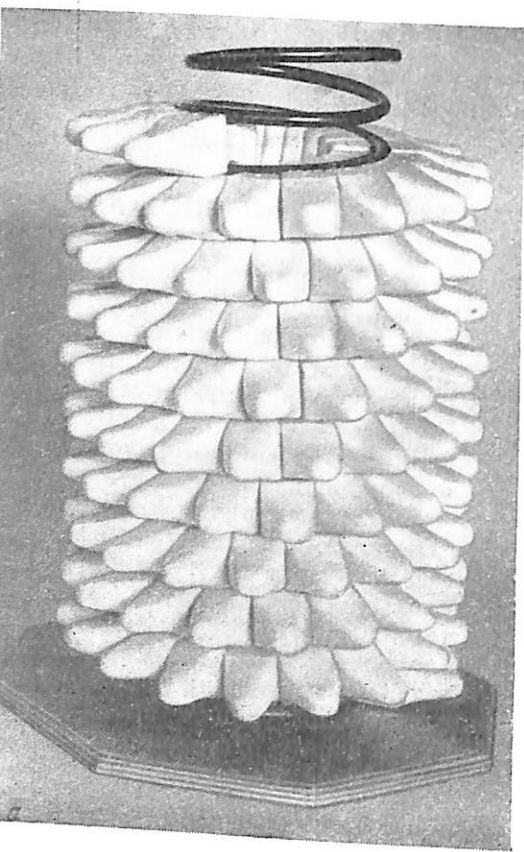


Рис. 1
 Модели вирионов
 а — табачной мозаики;
 б — полиомелита [4068];
 в — аденовируса [1708]

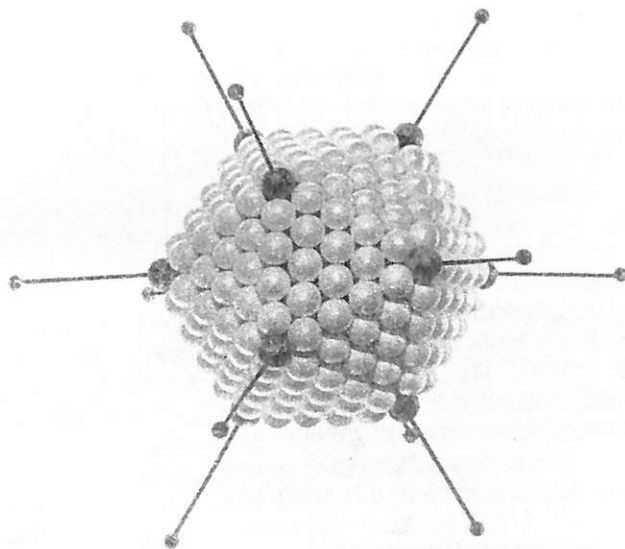
предположение, что капсид пикорнавирусов состоит из 32 капсомеров [1252].

У крупных вирусов, имеющих икосаэдрическую симметрию, количество капсомеров может быть большим. Так, у вириона аденовируса белковая оболочка состоит из 252 капсомеров [1068]. Весьма интересна работа Валентайна и Перейра [1708], которые показали, что капсид аденовируса типа 5 состоит из 240 капсомеров, имеющих 80 Å в диаметре, получивших название гексонов, и 12 капсомеров тоже диаметром 80 Å, расположенных по углам (пентонов), у которых имеется хвост 200 Å длиной и 20 Å шириной (рис. 1, в).

В вирионе вируса полиомы, по данным Уайлди с сотр., насчитывается 42 капсомера [1788], а у вируса папилломы Шоупа — 72 [754].

Белковые (структурные) субъединицы вирионов состоят из аминокислот, связанных между собой пептидной связью в определенной последовательности, строго специфичной для каждого вируса. В настоящее время полностью расшифрован порядок чередования аминокислот, входящих в состав белковой субъединицы вируса табачной мозаики. Белковая субъединица этого вируса представляет собой полипептидную цепь, состоящую из 158 аминокислотных остатков [324, 1699] (рис. 2).

Как уже говорилось выше, структурные единицы образуют белковую оболочку вириона, в которой как бы упакован второй важный его компонент — нуклеиновая кислота. По типу нуклеиновых кислот все вирусы можно разбить на две группы: вирусы,



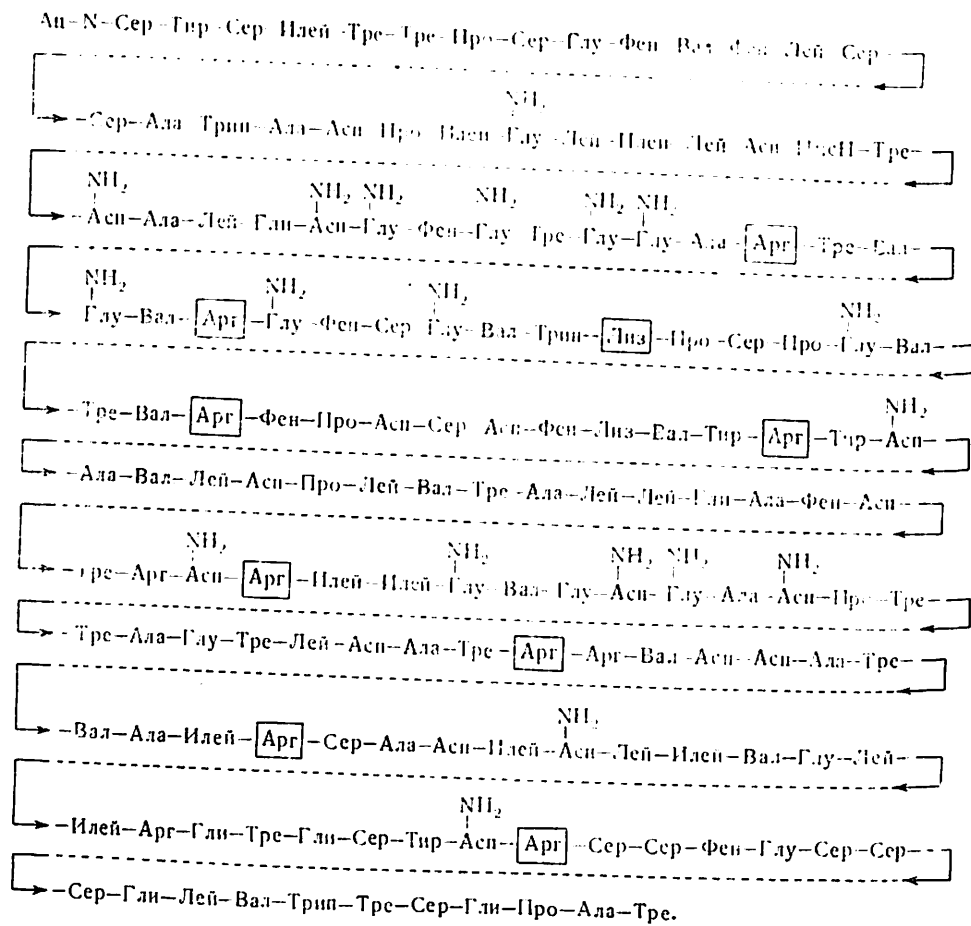


Рис. 2

Последовательность чередования аминокислот в белковой молекуле вируса табачной мозаики [1699].
В квадратах — точки расщепления трипсином

содержащие рибонуклеиновую кислоту (РНК), и вирусы, содержащие дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), причем во всех изученных до настоящего времени вирусах (если исключить группу пситтакоза) обнаруживается только один тип нуклеиновой кислоты — РНК или ДНК [330, 348, 770, 1102, 1231]. Этим вирусы принципиально отличаются от бактерий, простейших и клеток высших организмов, в которых содержатся оба типа нуклеиновых кислот. Ранние работы, в которых сообщалось о присутствии в некоторых вирусах двух типов нуклеиновых кислот, как например, в вирусе гриппа [1285], не подтвердились в более поздних исследованиях, проведенных с тщательно очищенными препаратами вирусов [344]. Следует, однако, отметить, что, по данным Плантерозе

с сотр. [1400], в высокоочищенном вирусе осповакцины обнаружилось, помимо ДНК, небольшое количество РНК, хотя полученные этими авторами результаты пока не получили подтверждения.

В настоящее время экспериментально доказано, что все изученные вирусы растений содержат только РНК. Подавляющее большинство бактериофагов содержит ДНК, однако, в последнее время обнаружен ряд РНК-содержащих бактериофагов [623, 723, 734, 764, 1104, 1189, 1235, 1372, 1623]. Среди вирусов животных и человека имеются как РНК-, так и ДНК-содержащие. Содержание нуклеиновых кислот у них, как это можно видеть из данных табл. 1, колеблется — от 0,8 до 40% у РНК-содержащих вирусов и от 7,2 до 30% у ДНК-содержащих.

РНК, входящая в состав большинства изученных вирусов животных и человека, представляет собой одну одноцепочечную молекулу с молекулярным весом около 2 млн. У вируса болезни Ньюкасла вес РНК несколько больше — $7,5 \cdot 10^6$, однако, РНК этого вируса также представляет собой одну одноцепочечную молекулу [680]. У реовируса количество РНК значительно больше, чем у других РНК-содержащих вирусов, причем, по данным Гоматоса и Тамма [844], а также Лэндриджа и Гоматоса [1118], РНК реовируса, подобно ДНК, состоит из двух комплементарных цепочек, однако, ее трехмерная структура отлична от ДНК. Двухцепочечная РНК была обнаружена также у вируса раневых опухолей и вируса карликовости риса [447, 1287].

Молекулярный вес вирусной ДНК обычно значительно выше, чем РНК, и колеблется от 60 до 150 млн. [348]. Однако ДНК некоторых опухолеобразующих вирусов животных, например, вируса папилломы кроликов (см. табл. 1), а также некоторых мелких бактериофагов, из которых ряд ($\phi X 174$, S_{13} , ϕR , fd и др.) содержит не двухцепочечную, как обычно, а одноцепочечную ДНК [1049, 1235, 1581, 1669], имеет меньший молекулярный вес.

Любопытные данные были получены Пфау и МакКри [1393] при изучении ДНК вируса осповакцины. Оказалось, что в популяции вируса около 5—10% частиц содержат не двуспиральную, а односпиральную ДНК. Разделение вирусных частиц центрифугированием в градиенте плотности показало, что во фракции вирусов с меньшей плотностью содержится как двуспиральная (60%), так и односпиральная ДНК (40%), в то время как в более плотной фракции содержится только двуспиральная ДНК.

В вирусной частице содержится обычно одна молекула нуклеиновой кислоты. Однако у вируса оспы коров, ДНК которого имеет молекулярный вес порядка 160 млн., предполагается содержание не одной, а двух молекул ДНК [1023]. Эти данные требуют дополнительных доказательств, тем более, что тонкие исследования, проведенные Дэвисоном с сотр. [624], Рубинштейном с сотр. [1480], проведенные Дэвисоном с сотр. [624], Рубинштейном с сотр. [1480], проведенные Дэвисоном с сотр. [624], Рубинштейном с сотр. [1480], а также Херши с сотр. [930], показали, что ДНК фагов T2, T4, T5

Таблица 1
СОДЕРЖАНИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ВЕС НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ
У НЕКОТОРЫХ ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

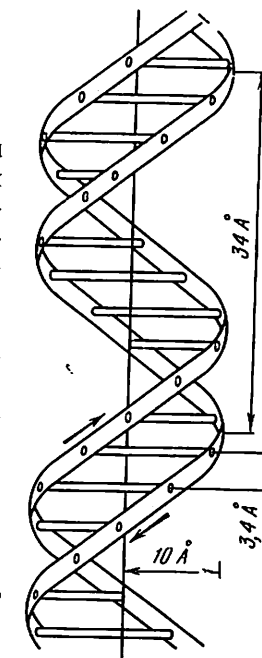
Вирус	Размер, мкм	Содержание нуклеиновой кислоты, %	Молекулярный вес $\times 10^8$	Длина в ангстремах
РНК-содержащие				
Полиомиелита	27	25	1,7	[1519]
Энцефаломиокардита	27	30	2,1	[731]
Ящура	25	40	3,1	[65, 1628]
Лошадиного энцефаломиелита	50	4,4	2,2	[1519]
Чумы кур	70	1,8	2,7	[1519]
Болезни Ньюкасла	80	—	7,5	[689]
Гриппа	80	0,8	2,3	[1519]
Миеобластоза	80—110	2,3	4,9	[38]
Реовирус (тип 3)	70—75	14,6	10,2	[871]
ДНК-содержащие				
Папилломы кроликов	45	8	7,0	[1761]
Аденовирус (тип 2)	70	13	10	[866]
Аденовирус (тип 5)	70	30	66	[351]
Герпеса простого	100	—	68	[1399]
Псевдобешенства	100	—	68	[1399]
Герпеса лошадей	100	—	84	[1399]
Осповакцины	260×220×220	7,8	156	[378]
Оспы коров	260×220×220	7,2	156	[378]

и Т7, имеющая молекулярный вес 120 млн., представляет собой одну гигантскую молекулу, которая в процессе выделения легко распадается на более мелкие.

Весьма интересно, что у ряда вирусов молекула ДНК имеет замкнутую циклическую структуру, причем такая структура обнаружена у вирусов, содержащих как одноцепочечную, так и двуцепочечную ДНК [693, 1069, 1582, 1685].

Нуклеиновые кислоты вирусов состоят из похожих, хотя и неодинаковых, химических единиц, однако, имеют существенные различия в молекулярной конфигурации [237, 286]. Высокомолекулярные молекулы нуклеиновых кислот, как известно, представляют собой длинную цепь, состоящую из многих нуклеотидов. Каждый нуклеотид в свою очередь состоит из трех компонентов: пуринового или пиримидинового основания, пятиуглеродного сахара и фосфорной кислоты. В ДНК этим сахаром является дезоксирибоза, а в РНК — рибоза, отличающаяся от дезоксирибозы присутствием гидроксильной группы у C_2 .

Рис. 3
Схема молекулярной конфигурации ДНК [1761]



В состав ДНК входят пурины — аденин и гуанин и пиримидины — цитозин и тимин (5-метилурацил). В ДНК некоторых бактериофагов вместо цитозина содержится 5-оксиметилцитозин [1804]. РНК содержит те же пуриновые основания — аденин и гуанин, а пиримидиновые — урацил и цитозин. Нуклеотиды в ДНК и РНК соединены одинаковыми связями за счет образования фосфатного мостика между C_3 и C_5 атомами последовательных остатков углеводов.

Цепи нуклеиновых кислот очень велики и содержат большое количество нуклеотидов. Как отмечает Рич [237], в состав ДНК бактериальных клеток входит примерно 10^8 нуклеотидов, что составило бы молекулярную цепочку длиной около 2 см. У млекопитающих на клетку приходится примерно 10^{10} нуклеотидов, что соответствует общей длине молекулы от 1 до 2 м. Нуклеиновые кислоты вирусов также состоят из значительного количества нуклеотидов. Так, в состав ДНК бактериофага Т4 входит 400 000 нуклеотидов [933]. У вирусов, содержащих РНК, количество нуклеотидов меньше, но тоже исчисляется тысячами. Например, в РНК вируса табачной мозаики, а также мелких вирусов животных и человека содержится примерно 6200 нуклеотидов [100, 805].

Как уже говорилось, ДНК и РНК, несмотря на сходство химического состава, имеют совершенно различную структурную организацию — пространственную молекулярную конфигурацию. Уотсон и Крик [1761] предложили модель строения ДНК, правильность которой подтверждена в последнее время многочисленными экспериментами. Согласно модели Уотсона и Крика (рис. 3), нативная молекула ДНК представляет собой двойную спираль диаметром 18—20 Å, состоящую из двух противоположно направленных полинуклеотидных цепочек, расположенных одна относительно другой таким образом, что углеводно-фосфатные компоненты находятся снаружи, а пуриновые и пиримидиновые основания — внутри.

Обе полинуклеотидные цепи свернуты в спираль вокруг общей оси, причем вся структура повторяется через каждые 10 пар оснований. Расстояние между нуклеотидами вдоль оси молекулы составляет 3,4 Å, а один виток, включающий 10 пар оснований, имеет длину вдоль оси 34 Å. Обе цепи удерживаются водородными

Оглавление

Предисловие	5
Введение	7
Глава I	
МАТЕРИАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ ВИРУСОВ	9
<i>Строение и химический состав вирусов</i>	9
<i>Вирусные нуклеиновые кислоты как носители наследственной информации</i>	19
<i>Генетический код</i>	29
<i>Структура вирусного гена</i>	36
Глава II	
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ	49
<i>Генетически однородные линии вирусов и методы их получения</i>	50
<i>Обозначения генетических признаков</i>	57
<i>Генетические признаки пикорнавирусов</i>	59
Вирус полиомиелита и другие кишечные вирусы	59
Вирус ящура	92
Кардиовирусы	96
<i>Генетические признаки арбовирусов</i>	97
<i>Генетические признаки миксовирусов</i>	104
Вирус гриппа	104
Вирус болезни Ньюкасла	112
Вирус чумы кур	119
Вирус везикулярного стоматита	119
Вирус эпидемического паротита	119
Вирус Сендай	119
Парагриппозный вирус	120
Парагриппозный обезьяний вирус SV ₅	120
Вирус бешенства	120
Вирус кори	122
<i>Генетические признаки вирусов группы оспы</i>	126
<i>Генетические признаки вируса герпеса и некоторых других вирусов</i>	144
Вирусы группы герпеса	144
Вирус полиомы	147
Обезьяний вирус SV ₄₀	148
Вирус саркомы Рауса	148
Аденовирусы	148
<i>Механизмы проявления генетических признаков</i>	154
<i>Полцистронное строение вирусов человека и животных</i>	168
РНК-содержащие вирусы	169
ДНК-содержащие вирусы	172

<i>Взаимосвязь между генетическими признаками, определяемыми in vitro, и их корреляция с патогенностью</i>	175
<i>Корреляция генетических признаков, определяемых in vitro, с патогенностью</i>	179

Глава III	
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ ВИРУСАМИ	192
<i>Множественная реактивация</i>	192
<i>Рекомбинация</i>	195
<i>Кросс-реактивация</i>	200
<i>Гетерозиготность</i>	206
<i>Транскапсидация</i>	208
<i>Негенетические взаимоотношения между вирусами</i>	208
Фенотипическое смещение	208
Реактивация вирусов группы оспы-осповакцины (феномен Берри — Дедрика)	210

Глава IV	
НАСЛЕДСТВЕННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ, СВЯЗАННАЯ С УСЛОВИЯМИ РАЗМНОЖЕНИЯ	212
<i>Изменчивость в естественных условиях размножения</i>	213
<i>Изменчивость в процессе специальных пассажей</i>	216
Пассажи на животных	217
Пассажи в куриных эмбрионах	223
Пассажи в опухолях in vivo	228
Пассажи в культуре ткани	228
<i>Пассажи с целью получения терморезистентных вариантов вирусов</i>	244
<i>Ненаследственная изменчивость, связанная с включением субстратов клетки-хозяина в вирусную частицу</i>	244
<i>Механизмы наследственной изменчивости вирусов в процессе пассажей</i>	246

Глава V	
НАСЛЕДСТВЕННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ, ИНДУЦИРУЕМАЯ МУТАГЕНАМИ, И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МУТАЦИЙ	255
<i>Изменчивость, индуцируемая ионизирующей и ультрафиолетовой радиацией</i>	259
<i>Изменчивость, вызываемая ультразвуковыми волнами</i>	263
<i>Изменчивость наследственных свойств при действии повышенной температуры и кислот среды</i>	264
<i>Мутации, индуцируемые аналогами оснований</i>	267
<i>Изменчивость при действии алкилирующих соединений</i>	271
<i>Мутации, возникающие при действии азотистой кислоты</i>	275
<i>Изменчивость, индуцируемая акридиновыми красителями</i>	283
<i>Изменения наследственных свойств, вызываемые гидроксиламином</i>	286
<i>Специфичность действия мутагенов и пути направленного изменения наследственных свойств вирусов</i>	295
ЛИТЕРАТУРА	303
ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ	343