

## НЕСФАТИН-1: ВЛИЯНИЕ НА МАРКЕРЫ КОСТНОГО ОБМЕНА У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Квливидзе Т.З.<sup>1</sup>, Полякова Ю.В.<sup>2</sup>, Заводовский Б.В.<sup>1,2</sup>, Королик О.Д.<sup>1</sup>, Загороднева Е.А.<sup>1</sup>, Яковлев А.Т.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Волгоград, e-mail post@volgmed.ru;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», Волгоград, e-mail: rebma@rebma.ru

Нуклеобиндин-1 и нуклеобиндин-2 представляют собой многофункциональные белки, связывающие ДНК и Ca<sup>2+</sup> с различными сигнальными путями. Нуклеобиндин-1 и -2 были открыты в 1990-е гг. Доказано, что они могут выполнять различные функции, основные из которых – регуляция воспаления и образование костной ткани. При обработке NUCB2 прогормон-конвертазами высвобождаются 3 белка: несфатин (НФ)-1, -2 и -3. Это открытие произошло в 2006 г. Oh-I и его коллегами. Несфатин-1 – эндогенный пептид. Описаны его различные действия на метаболизм глюкозы и липидов, желудочно-кишечных функций, термогенез, тревогу и депрессию, сердечно-сосудистую систему и репродуктивную систему. Несфатин-1 (НФ-1) – новый биоактивный пептид с плеiotропной активностью. Имеется информация о его провоспалительной активности и влиянии на остеогенез. Обследованы 110 пациентов с ревматоидным артритом (РА) и 30 человек контрольной группы. У пациентов с РА определяется достоверно более высокий уровень НФ-1 по сравнению с группой контроля. Не обнаружено ожидаемой корреляции уровня НФ-1 с композитным составом тела у пациентов с РА. Выявлена взаимосвязь между НФ-1 и маркером формирования костного матрикса (P1NP), что свидетельствует о возможном влиянии НФ-1 на дифференцировку и функцию остеобластов.

Ключевые слова: несфатин-1, адипокины, ревматоидный артрит, композитный состав тела, остеогенез

## NESFATIN-1: EFFECTS ON BONE EXCHANGE MARKERS IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Kvlividze T.Z.<sup>1</sup>, Polyakova Y.V.<sup>2</sup>, Zavadovskiy B.V.<sup>1,2</sup>, Korolik O.D.<sup>1</sup>, Zagorodneva E.A.<sup>1</sup>, Yakovlev A.T.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The Volgograd State Medical University, Volgograd, e-mail post@volgmed.ru;

<sup>2</sup>The research institute of clinical and experimental rheumatology Named after A.B. Zborovskiy, Volgograd, e-mail: rebma@rebma.ru

Nucleobindin-1 and nucleobindin-2 are DNA and calcium binding, secreted proteins with various signaling paths. Nucleobindin-1 and 2 were discovered in the nineties the twentieth century. It is proved that they can perform various functions, the main of which are: participation in the regulation of appetite, in the pathogenesis of inflammation, the effect on the formation of the bone matrix. In 2006, Oh-I and co-authors discovered that NUCB2 is processed by prohormone convertases: nesfatin-1 (NF-1), 2 and 3. NF-1 is a new bioactive peptide with pleiotropic activity. Its effect on the metabolism of glucose and lipids, on the functions of the gastrointestinal tract, thermogenesis, anxiety and depression, the cardiovascular and reproductive systems has been described. There is information about the pro-inflammatory activity of NF-1 and its effect on osteogenesis. We examined 110 patients with rheumatoid arthritis and 30 people in the control group. In patients with RA, a significantly higher level of NF-1 compared with the control is determined. No expected correlation of NF-1 level with composite body composition in patients with RA was found. The relationship between NF-1 and the bone matrix formation marker (P1NP) was revealed, which indicates the possible effect of NF-1 on the differentiation and function of osteoblasts.

Keywords: nesfatin-1, adipokines, rheumatoid arthritis, composite body composition, osteogenesis

Нуклеобиндин-1 и нуклеобиндин-2 (NUCB2) представляют собой многофункциональные белки, связывающие ДНК и Ca<sup>2+</sup> с различными сигнальными путями. Нуклеобиндин-1 и -2 были открыты в 1990-е гг. Доказано, что они могут выполнять различные функции, основные из которых – регуляция воспаления и образование костной

ткани. При обработке NUCB2 прогормон-конвертазами высвобождаются 3 белка: несфатин (НФ)-1, -2 и -3. Это открытие произошло в 2006 г. Oh-I и его коллегами. Однако было обнаружено, что НФ-2 и -3 не оказывают явного влияния на метаболизм, в отличие от НФ-1. Хотя рецепторы, которые опосредуют эффекты НФ-1, в настоящее время неизвестны, он считается эндогенным пептидом с различными функциями. Описаны различные эффекты НФ-1 на обмен глюкозы и липидов, на работу желудочно-кишечного тракта, термогенез, тревогу и депрессию, сердечно-сосудистую систему и репродуктивную систему [1]. Имеются работы, отмечающие развитие эффектов НФ-1 на метаболизм глюкозы через рецептор грелина. Также основные пищеварительные ферменты отвечают на воздействие грелина и НФ-1, подтверждая тесную связь этих пептидов [2]. НФ-1 оказывает влияние на центральные и периферические ткани, регулируя процессы метаболизма, репродукции, эндокринные и другие функций. НФ-1 относится к белкам с нейроэндокринным влиянием и анорексигенной активностью [3], наиболее высокие концентрации НФ-1 обнаруживаются в центральной нервной системе и в слизистой желудочно-кишечного тракта. Желудок был идентифицирован как основной источник периферического НФ-1. Существует мнение, что НФ-1 в первую очередь через центральные механизмы вызывает тревогу, а периферические эффекты стимулируют потребление пищи. Причем у женщин эта связь прослеживается наиболее четко, в отличие от мужчин, что позволяет предположить гендерные различия в эффектах НФ-1 на потребление пищи при повышенной тревожности. Аналогичные данные получены в отношении депрессии. Повышение уровня НФ-1 связано с более тяжелыми формами депрессивных состояний, одновременно у этих пациентов отмечались повышенные уровни таких маркеров воспаления, как С-реактивный белок (СРБ) и интерлейкин (ИЛ)-6 [1]. Изначально НФ-1 был отнесен к классу адипокинов [4]. При ожирении выявляется положительная корреляция между процентом жира и циркулирующим в сыворотке НФ-1 [5], обнаружено различное содержание НФ-1 у пациентов с сахарным диабетом (СД) 2-го типа, здоровых лиц и пациентов с СД 1-го типа [6]. Считается, что НФ-1 ответственен за чувство сытости. Его синтез сосредоточен в гипоталамусе, имеет важное значение в регуляции энергетического баланса [4]. Также НФ-1 ассоциирован с меланокортиновой сигнальной системой (МСС). Биорегуляция значительного количества физиологических функций и гомеостаза связана с меланокортинами. В молекуле препропиомеланокортина (ПОМК) биологически активные домены у всех млекопитающих расположены сходным образом. Различные биологические пептиды синтезируются в результате череды химических трансформаций ПОМК [7]. Отмечается обратная корреляция между уровнем НФ-1 в сыворотке крови и в структуре гипоталамуса. Выявлено, что НФ-1 может проникать через гематоэнцефалический барьер в обоих направлениях, что обеспечивает поддержку

гуморального пути передачи сигналов. Концентрация НФ-1 может изменяться при смене питания и введении в программу реабилитации физических тренировок. В результате уменьшается его уровень в сыворотке крови и повышается в тканях гипоталамуса [8]. Уровень половых гормонов также влияет на уровень НФ-1 [8]. Кроме влияния на метаболизм жировой и нервной ткани [1], имеется информация и о провоспалительной активности НФ-1 [7]. В последнее время появились работы об активном участии НФ-1 в остеогенезе [8].

Остеогенная активность НФ-1 может быть особо интересной. В сегодняшней клинической практике наиболее часто применяются лекарственные препараты, преимущественно блокирующие функции остеокластов, приводя к ограничению костной резорбции. Внутривенное введение НФ-1 овариоэктомизированным крысам (OVX) в течение 2 месяцев в эксперименте приводит к увеличению минеральной плотности костной ткани (BMD – bone mineral density) в поясничных позвонках и бедренных костях. Отмечается значимое повышение показателей щелочной фосфатазы в присутствии НФ-1 в преостеобластных клетках мышей (MC3T3-E1). НФ-1 способствует более активной дифференциации остеобластов и повышению минерализации костной ткани. Есть работы, показывающие незначительное ингибирование остеокластогенеза у мышей [9]. Функции биоактивных молекул зависят от выраженности экспрессии клеток-мишеней. Роль тканевых цитокинов в обменных процессах может отличаться при различных исходных состояниях живой системы. Можно предположить, что уровень НФ-1 влияет на процессы формирования костного матрикса в норме и при патологии.

Цель исследования – определение взаимосвязи уровня НФ-1, минеральной плотности костной ткани, композитного состава тела и маркеров костного метаболизма у пациентов с ревматоидным артритом (РА).

**Материалы и методы исследования.** В исследование включены 110 пациентов с РА (средний возраст  $54,07 \pm 11,32$  года; в дальнейшем  $M \pm \text{Std.dev}$ ) и 30 человек контрольной группы без жалоб на боли в суставах. Диагноз РА верифицирован на основе типичных клинических, биохимических, серологических данных соответственно классификационным критериям ACR/EULAR для РА (2010). Также пациенты с РА были обследованы с помощью двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии с использованием денситометра LUNAR DPX-Pro с определением композитного состава тела (КСТ), минеральная плотность костной ткани (МПКТ) определялась в стандартных позициях (тела I–IV поясничных позвонков и проксимальный отдел левой бедренной кости). Клиническое и лабораторное обследование проводилось с использованием стандартных методов. Уровни НФ-1 в сыворотке крови измерялись непрямым твердофазным иммуноферментным анализом с использованием коммерческой тест-системы Nesfatin-1 ELISA (RaiBiotech, кат. EIA-NESF),

маркеры костного обмена определяли с использованием коммерческих тест-систем P1NP ELISA Kit CLOUD – CLONE CORP, 25-Hydroxy Vitamin D EIA Kit и Serum CrossLaps ELISA, IDS Ltd согласно инструкциям, прилагаемым к набору.

### Результаты исследования и их обсуждение

#### Результаты

Средняя концентрация НФ-1 у пациентов с РА составила  $50,49 \pm 34,05$  нг/мл, что достоверно выше показателей здоровых лиц. Средний уровень НФ-1 в сыворотке крови здоровых лиц –  $31,61 \pm 3,17$  нг/мл ( $M \pm \sigma$ ), исходя из данных значений уровень референсных показателей НФ-1 у здоровых лиц, определяемый как  $M \pm 2\sigma$ , составил от 25,27 до 37,95 нг/мл.

По уровню НФ-1 все пациенты с РА были разделены на 2 подгруппы. В 1-ю вошли пациенты ( $n=44$ ) с нормальной концентрацией НФ-1 в сыворотке (менее 37,95 нг/мл), во 2-ю ( $n=66$ ) – с повышенным уровнем НФ-1 (более 37,95 нг/мл).

Взаимосвязь между минеральной плотностью костной ткани и уровнем НФ-1 при РА показана в таблице 1.

Таблица 1

Взаимосвязь между минеральной плотностью костной ткани и уровнем НФ-1 при РА

Группы МПКТ	Нормальный уровень НФ-1, <37,95 нг/мл, N=44	Повышенный уровень НФ-1, >37,95 нг/мл, N=66	Достоверность различий между группами (p)
BMD L1-L4 <sup>9</sup>	$1,037 \pm 0,17$	$1,039 \pm 0,144$	$F=0,002$ ; $p=0,963$
BMD Total <sup>10</sup>	$0,904 \pm 0,154$	$0,895 \pm 0,139$	$F=0,087$ ; $p=0,767$
BMD Neck <sup>11</sup>	$0,876 \pm 0,14$	$0,859 \pm 0,12$	$F=0,377$ ; $p=0,540$

<sup>9</sup> BMD L1-L4 – Bone Mineral Density (L1-L4) – МПКТ тел L1-L4 позвонков (1-4-го поясничных позвонков)

<sup>10</sup> BMD Total – Hip Bone Mineral Density – МПКТ проксимального отдела бедренной кости

<sup>11</sup> BMD Neck – Femoral Neck BMD – МПКТ шейки бедренной кости

В результате исследования не было выявлено значимой корреляции между уровнем НФ-1 и композитным составом тела у пациентов с РА.

Коэффициент корреляции между уровнем НФ-1 и композитным составом тела у пациентов с РА показан в таблице 2.

Таблица 2

Коэффициент корреляции между уровнем НФ-1 и композитным составом тела у пациентов с РА

	Коэффициент корреляции (r)	Достоверность (p)
Lean % Total <sup>1</sup>	0,0438	0,650

BMC % Total <sup>2</sup>	0,0074	0,939
Fat % Total <sup>3</sup>	0,0236	0,806
Fat gynoid <sup>4</sup>	0,0042	0,965
Fat android <sup>5</sup>	0,0362	0,707
Fat, g <sup>6</sup>	0,0295	0,760
Lean, g <sup>7</sup>	0,413	0,668
BMC, g <sup>8</sup>	0,0421	0,662

<sup>1</sup> lean % Total – % Lean Body Mass of the Total – % общей мышечной/тощей массы к общей массе пациента

<sup>2</sup> BMC % Total – % Body Mineral content of the Total – % содержания минералов в костной ткани к общей массе пациента

<sup>3</sup> Fat % Total – % Fat of the Total – % содержания жировой ткани к общей массе пациента

<sup>4</sup> Fat gynoid – Gynoid fat distribution - распределение жира по гинеидному типу (ягодично-бедренному)

<sup>5</sup> Fat android – Android fat distribution – распределение жира по андройдному типу (центральному)

<sup>6</sup> Fat, g – общая жировая масса

<sup>7</sup> Lean, g – общая мышечная масса

<sup>8</sup> BMC, g – содержания минералов в костной ткани

Мы также не выявили достоверных различий в уровне сывороточного С-концевого телопептида коллагена I типа ( $\beta$ -СТх) между пациентами 1-й и 2-й групп. Одновременно определена статистически значимая корреляция между НФ-1 и N-терминальным пропептидом проколлагена I типа (P1NP)) ( $r=0,218$ ,  $p=0,022$ ) (табл. 3). Мы не отметили каких-либо существенных взаимосвязей между уровнем НФ-1 в сыворотке крови и МПКТ на каком-либо участке, а также корреляции между уровнем НФ-1 с мышечной или жировой массой у пациентов с РА. Уровень СРБ и скорость оседания эритроцитов положительно коррелировали с показателями НФ-1.

Таблица 3

Взаимосвязь между уровнем НФ-1, маркерами костного обмена и уровнем 25(ОН) витамина D при РА

	Коэффициент корреляции (r) с несфатином-1	Достоверность (p)
P1NP <sup>12</sup>	0,2180	0,022
25(ОН)D <sup>13</sup>	0,125	0,122
$\beta$ -СТх, S-СТХ <sup>14</sup>	0,1566	0,102

<sup>12</sup> P1NP – N-terminal propeptide of type I collagen (Total P1NP) – N-терминальный пропептид проколлагена 1-го типа

<sup>13</sup> 25(ОН)D – 25-ОН vitamin D-25(ОН) витамин D

<sup>14</sup>  $\beta$ -СТх –  $\beta$ -Cross Laps –  $\beta$ -С-терминальный телопептид сыворотки

Статистическая обработка данных клинического обследования проводилась с использованием программного пакета «STATISTICA 10.0 для Windows». Количественные данные обрабатывали статистически с использованием параметрического критерия достоверности Стьюдента, качественные данные – с применением непараметрического критерия достоверности «хи-квадрат». Достоверность различий между группами определяли с помощью дисперсионного анализа. Результаты считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### *Обсуждение*

Изучив имеющиеся в небольшом количестве работы, показывающие участие НФ-1 в пищевом поведении, принадлежность НФ-1, по мнению ряда ученых, к группе адипокинов, мы планировали увидеть взаимосвязь между его концентрацией и массой жировой ткани [5, 8]. Мы не выявили данную корреляцию. Полученные нами результаты позволяют предположить, что повышенное содержание НФ-1 может быть обусловлено не только избыточным количеством жировой ткани, но и другими факторами. В настоящее время нет четкого понимания, с какими рецепторами взаимодействует НФ-1. Тем не менее НФ-1 представляет собой эндогенный пептид с множественными функциями, воздействует на центральные и периферические ткани, участвуя в метаболизме, репродукции и других процессах. Имеются работы, подтверждающие участие нуклеобиндинов и их пептидов в клеточной биологии и физиологии всех классов животных и человека. Сложное взаимодействие внешних и внутренних факторов обуславливает анорексигенную активность, влияние на психические процессы [3], ассоциацию между концентрацией НФ-1 и развитием СД 2-го типа [6], что согласуется с данными литературы. В ряде исследований доказаны провоспалительная активность НФ-1 [7] и его влияние на остеокластогенез [4, 10].

РА относится к значимому фактору риска развития системного остеопороза, а первым рентгенологическим проявлением РА является околосуставный ОП. Считается, что суставная деструкция при РА и разрежение костной ткани имеют общие патогенетические механизмы: активация системы иммунитета, гиперпродукция провоспалительных и недостаточный синтез противовоспалительных цитокинов, дисбаланс в системе RANKL/RANK/OPG. Совокупность перечисленных факторов приводит к активации остеокластогенеза и повышению костной резорбции, хотя роль каждого из этих факторов в нарушении костного метаболизма пока еще остается не совсем ясной [11]. Учитывая провоспалительную активность НФ-1, его уровень должен коррелировать с маркерами разрушения костной ткани [12, 13]. Однако корреляции с  $\beta$ -СТх мы не выявили. Напротив, уровень НФ-1 коррелировал с показателями P1NP. В клинической практике количество

вновь синтезированного коллагена 1-го типа оценивают именно по содержанию P1NP, который отличается высокой стабильностью и является N-(амино)терминальным фрагментом проколлагена 1-го типа. Примерно 90% органического матрикса костной ткани составляет коллаген 1-го типа, за синтез и качество органической части костной ткани отвечают остеобласты (ОБ). Можно предположить, что НФ-1 оказывает влияние на ОБ и не влияет на состояние неорганического матрикса гидроксиапатита, основных элементов (кальция и фосфатов, других макро- и микроэлементов: натрия, магния, калия, хлора, фтора, карбонатов и цитрата), который составляет порядка 70% костной ткани. Органические соединения костного матрикса отвечают за регуляцию минерализации и уплотнение коллагенового матрикса. Соответственно провоспалительный цитокин НФ-1 оказывает парадоксальное влияние на обмен костной ткани, что требует дополнительных исследований. Имеется информация о повышенном содержании гена НФ-1 в остеоцитах при обследовании пациентов с остеоартрозом [10]. Также НФ-1, проявляя явные провоспалительные свойства, необъяснимо положительно влияет на сердечно-сосудистую систему, улучшая сердечную сократимость, релаксацию аорты, снижая риск фибрилляции предсердий и оказывая общий кардиопротективный эффект [1]. НФ-1 – новый биоактивный пептид с плейотропной активностью. Механизмы действия НФ-1 на функцию ОБ в настоящее время активно изучаются на экспериментальных моделях [13, 14].

**Выводы.** Таким образом, в ходе нашего исследования по изучению взаимосвязи между уровнем НФ-1, минеральной плотностью костной ткани, композитным составом тела и маркерами костного метаболизма у пациентов с ревматоидным артритом мы не выявили зависимости между повышенным уровнем несфатина-1 в сыворотке крови и минеральной плотностью костной ткани в стандартных позициях и с композитным составом тела у пациентов с РА. Нами была выявлена взаимосвязь между несфатином-1 и маркером формирования костного матрикса (P1NP), что свидетельствует о возможном влиянии несфатина-1 на дифференцировку и функцию остеобластов. Роль несфатина-1 в костном обмене в норме и патологии мало изучена в настоящее время и, вероятно, не связана с его провоспалительной активностью в периферических тканях.

### Список литературы

1. Schalla M., Stengel A. Current Understanding of the Role of Nesfatin-1. J Endocr Soc. 2018. Vol. 2 (10). P. 1188-1206.
2. Fan X.T., Tian Z., Li S.Z., Zhai T., Liu J.L., Wang R., Zhang C.S., Wang L.X., Yuan J.H., Zhou Y., Dong J. Ghrelin Receptor Is Required for the Effect of Nesfatin-1 on Glucose

Metabolism. Front Endocrinol (Lausanne). 2018. Vol. 9. P. 633. DOI: 10.3389/fendo.2018.00633. eCollection 2018.

3. St-Pierre D.H., Martin J., Shimizu H., Tagaya Y., Tsuchiya T., Marceau S., Biertho L., Bastien M., Caron-Cantin S.M., Simard S., Richard D., Cianflone K., Poirier P. Association between nesfatin-1 levels and metabolic improvements in severely obese patients who underwent biliopancreatic derivation with duodenal switch. *Peptides*. 2016. vol. 86. P. 6-12. DOI: 10.1016/j.peptides.2016.09.014.

4. Scotece M., Conde J., Abella V., López V., Lago F., Pino J., Gómez-Reino J.J., Gualillo O. NUCB2/nesfatin-1: a new adipokine expressed in human and murine chondrocytes with pro-inflammatory properties, an in vitro study. *J Orthop Res*. 2014. Vol. 32 (5). P. 653-660. DOI: 10.1002/jor.22585.

5. Khadijeh M., Hossein-nezhad A., Keshavarz S.A., Koohdania F., Eshraghian M.R., Saboor-Yaraghia A.A., Hosseinid S., Chamaria M., Zareei M., Djalalia M. Association of nesfatin-1 level with body composition, dietary intake and resting metabolic rate in obese and morbid obese subjects. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2015. vol. 9 (4). P. 292-298.

6. Li Q.C., Wang H.Y., Chen X., Guan H.Z., Jiang Z.Y. Fasting plasma levels of nesfatin-1 in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus and the nutrient-related fluctuation of nesfatin-1 level in normal humans. *Regulatory Peptides*. 2010. vol. 159. (1-3). P. 72-77.

7. Левицкая Н.Г., Каменский А.А. Меланокортиновая система // Успехи физиологических наук. 2009. № 40 (1). С. 44-65.

8. Chen D., Cao S., Chang B., Ma T., Gao H., Tong Y., Li T., Han J., Yi X. Increasing hypothalamic nucleobindin 2 levels and decreasing hypothalamic inflammation in obese male mice via diet and exercise alleviate obesity-associated hypogonadism. *Neuropeptides*. 2019. vol. 74. P. 34-43. DOI: 10.1016/j.npep.2018.10.005.

9. Li R., Wu Q., Zhao Y., Jin W., Yuan X., Wu X., Tang Y., Zhang J., Tan X., Bi F., Liu J.N. The novel pro-osteogenic activity of NUCB2(1-83). *PLoS One*. 2013. vol. (4). e61619.

10. Brosch S., Redlich K., Pietschmann P. Pathogenesis of osteoporosis in rheumatoid arthritis. *Acta Med Austriaca*. 2003. vol. 30 (1). P. 1-5.

11. Zhang Y., Shui X., Lian X., Wang G. Serum and Synovial Fluid Nesfatin-1 Concentration is Associated with Radiographic Severity of Knee Osteoarthritis. *Med Sci Monit*. 2015. vol. 21. P. 1078-1082.

12. Kvlividze T.Z., Zavodovsky B.V., Akhverdyan Y.R., Sivordova L.E., Polyakova Y.V., Lavrov D.P., Yakovlev A.T. Elevated Nesfatin-1 levels in patients with Rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2018. DOI: 10.1136 / annrheumdis-2018-eular.4459 (In Russ.).

13. Boyle W.J., Simonet W.S., Lacey D.L. Osteoclast Differentiation and Activation. *Nature*. 2003. vol. 423 (6937). P. 337-342. DOI: 10.1038/nature01658.
14. Gravallese E.M. Bone destruction in arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2002. vol. 61. P. 84-86.