

Ткачук О.В.

Буковинський державний медичний
університет, м. ЧернівціСТРУКТУРА ЛІМФОЇДНОЇ ПОПУЛЯЦІЇ
ТИМУСА ЩУРІВ ЗІ СТРЕПТОЗОТОЦИН-
ІНДУКОВАНИМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ,
УСКЛАДНЕНИМ ІШЕМІЧНО-
РЕПЕРФУЗІЙНИМ ПОШКОДЖЕННЯМ
ГОЛОВНОГО МОЗКУ**Ключові слова:** цукровий діабет,
ішемія-реперфузія головного мозку,
тимоцити.**Резюме.** Вивчено вплив неповної глобальної ішемії-реперфузії головного мозку на структуру лімфоїдної популяції тимуса в самців-щурів із чотиримісячним цукровим діабетом. Встановлено, що дане втручання в кірковій зоні тимуса контрольних щурів знижує щільність незрілих клітин та підвищує щільність більш зрілих класів клітин, а у тварин із цукровим діабетом – має зворотні ефекти на незрілі та більш зрілі класи клітин. У мозковій зоні тимуса контрольних щурів ішемія-реперфузія головного мозку зменшує сумарну щільність незмінених клітин за рахунок усіх класів, крім малих тимоцитів, а в щурів із діабетом – підвищує щільність незрілих великих тимоцитів та знижує щільність найбільш зрілих.**Вступ**

Розвиток цукрового діабету 1 типу характеризується дисфункцією тимуса з подальшими розладами імунної системи, які виникають унаслідок появи в крові аутоантитіл до панкреатичних острівців [3, 12]. Тому не дивно, що багато наукових напрацювань, спрямованих на пошуки засобів терапії цукрового діабету, було присвячено дослідженню патогенезу порушень функціонування тимуса. Наслідком цих досліджень стали відомості про порушення у хворих на ЦД 1 типу цитоархітектоніки тимуса, функцій тимоцитів, процесів їх дозрівання та диференціації, синтезу тимічних гормонів тощо [4, 6, 9, 13, 14]. Перспективність таких наукових спрямувань була підтверджена експериментально та клінічно розробкою низки засобів покращання перебігу цукрового діабету, оснований на корекції аутоімунних порушень [7, 10, 12, 13].

Сьогодні все більша увага дослідників приділяється вивченню поєднаної аутоімунної патології [5]. У хворих на цукровий діабет ускладненням основного захворювання з аутоімунним компонентом є, насамперед, ішемічні пошкодження головного мозку, які можуть виникати як внаслідок гострих розладів церебрального кровообігу, так і за рахунок коматозних станів [2, 8]. Отже, вивчення поєданого впливу цукрового діабету та ішемії-реперфузії головного мозку на співвідношення різних класів лімфоцитів у тимусі може надати певну інформацію про характер тимічної дизрегуляції за цих умов.

Мета роботи – вивчити структуру клітин

лімфоїдної популяції тимуса щурів при поєданому впливі стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету та ішемічно-реперфузійного пошкодження головного мозку.

Матеріал і методи

Вивчення впливу 20-хвилинної двобічної каротидної ішемії з наступною реперфузією на структуру лімфоїдної популяції тимуса здійснено в білих нелінійних самців-щурів контрольної групи та з чотиримісячним цукровим діабетом. Останній моделювали однократним внутрішньочеревним введенням двомісячним щурам стрептозотоцину (Sigma, США, 60 мг/кг маси тіла) [6]. У дослід брали щурів із рівнем глікемії вище 10 ммоль/л. Для контрольних досліджень у частини інтактних щурів і щурів із цукровим діабетом виділяли сонні артерії, подразнювали їх стінку без припинення кровотоку. Тварин виводили з експерименту на 12 добу декапітацією під наркозом.

На гістологічних зрізах тимуса, пофарбованих гематоксилін-еозином, в кортикальній і медулярній зонах залози вивчали структуру лімфоїдної популяції (щільність розташування різних класів тимоцитів на 1 мм²) та їх відсоткове співвідношення. Математичний аналіз різних класів лімфоїдних клітин тимуса здійснювали за допомогою флуоресцентного мікроскопа AXIOSKOP [1, 6]. Зображення вводили в комп'ютерну систему цифрового аналізу VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина).

Результати опрацьовано з використанням пакету прикладних і статистичних програм VIDAS

2.5 (Kontron Elektronik, Німеччина) та EXCELL із пакета MS Office 2000 (Microsoft Corp., США) з використанням t-критерію Ст'юдента. Дані представлені у вигляді середніх арифметичних та стандартного відхилення.

Обговорення результатів дослідження

Цукровий діабет призвів до зниження сумарної щільності як нормальних, так і деструктивних тимоцитів у кірковій зоні тимуса (табл. 1). Ішемія-реперфузія головного мозку зменшила щільність деструктивних тимоцитів у даній зоні залози контрольних щурів та не вплинула на сумарну щільність незмінених і деструктивних клітин у тварин із цукровим діабетом.

У мозковій зоні тимуса цукровий діабет також спричинив зниження всіх вивчених показників, а ішемія-реперфузія головного мозку в контрольних тварин призвела до зниження щільності розташування нормальних тимоцитів. На відміну від контрольних щурів, у тварин із діабетом каротидна ішемія не вплинула на сумарну кількість незмінених та деструктивних клітин. Однак висновки щодо ефектів здійснених нами експериментальних втручань на зміни в тимусі на підставі вивчення сумарної кількості клітин малоінформативні, тому ми дослідили структуру та відсоткове співвідношення різних класів лімфоцитів за даних експериментальних умов (таблиці 2,3).

Проведений аналіз дозволив встановити, що в кірковій зоні тимуса тварин контрольної групи ішемія-реперфузія зменшила щільність незмінених лімфобластів та великих тимоцитів, великих деструктивних лімфоцитів і підвищила щільність середніх клітин без ознак деструкції.

Таким чином, зрозуміло, що відсутність достовірних змін сумарної щільності нормальних тимоцитів пояснюється різноспрямованими змінами щільності різних класів клітин, а зниження щільності деструктивних відбувається, головним чином, за рахунок великих тимоцитів. При цьому слід зазначити, що недостовірні зміни кількості деструктивних клітин мали місце серед усіх класів.

Цукровий діабет спричинив зниження щільності всіх класів незмінених лімфоїдних клітин, за винятком малих, а також – щільності деструктивних середніх та малих тимоцитів.

Реакція тимоцитів кіркової зони на ішемію-реперфузію головного мозку в щурів із діабетом відрізнялася від такої в контрольних щурів: нами виявлено зростання щільності нормальних лімфобластів та великих тимоцитів і зниження щільності середніх та малих клітин. Щодо клітин з ознаками деструкції, то в цій популяції відмічено зниження кількості великих і середніх тимоцитів при одночасному підвищенні – малих.

У кірковій зоні залози ішемія-реперфузія головного мозку в щурів контрольної групи дещо змінила відсотковий розподіл тимоцитів за рахунок зниження частки незмінених великих лімфоцитів та зростання частки середніх.

Цукровий діабет знизив частку незмінених лімфобластів та великих тимоцитів і підвищив частку середніх і малих. Достовірно знизилася також частка деструктивних малих тимоцитів. Цікаво, що ішемічно-реперфузійне пошкодження головного мозку у тварин із діабетом, спричинивши обернений стосовно діабету перерозподіл тимоцитів, наблизило відсоткове співвідношен-

Таблиця 1

Вплив ішемії-реперфузії на сумарну щільність лімфоїдних клітин у кірковій зоні тимуса щурів із цукровим діабетом (на 1 мм² залози) (M±m)

Група спостереження	Нормальні лімфоцити	Деструктивні та апоптотичні
Кіркова зона		
Контроль	12048±220	1419±70,7
Ішемія-реперфузія	11930±191	1193±53,0*
Діабет	10853±111**	1142±65,4*
Діабет та ішемія-реперфузія	10716±189	1016±55,7
Мозкова зона		
Контроль	9125±160	2431±99
Ішемія-реперфузія	8051±134***	2350±83
Діабет	8007±141***	2181±81*
Діабет та ішемія-реперфузія	7755±136	2278±77

Примітка: в таблицях 1-5: * – вірогідність відмінностей стосовно параметрів у контрольних тварин; ^ - стосовно параметрів у тварин із цукровим діабетом; *, ^ – p< 0,05; **, ^^ p< 0,005; ***, ^^ p< 0,001

Таблиця 2

Структура лімфоїдної популяції в кірковій зоні тимуса контрольних щурів та тварин із цукровим діабетом після ішемії-реперфузії головного мозку (M±m)

Класи клітин лімфоїдної популяції	Нормальні клітини	Клітини з ознаками деструкції
Контроль		
Лімфобласти	$\frac{333,3 \pm 28,4}{2,684 \pm 0,250\%}$	$\frac{12,98 \pm 5,21}{0,096 \pm 0,039\%}$
Великі лімфоцити	$\frac{3765 \pm 119}{29,58 \pm 1,11\%}$	$\frac{411,2 \pm 33,9}{3,014 \pm 0,238\%}$
Середні лімфоцити	$\frac{5848 \pm 167}{42,87 \pm 0,78\%}$	$\frac{562,7 \pm 36,09}{4,123 \pm 0,258\%}$
Малі лімфоцити	$\frac{2101 \pm 131}{14,61 \pm 0,82\%}$	$\frac{344,1 \pm 33,9}{2,329 \pm 0,222\%}$
Апоптотичні клітини	$\frac{88,73 \pm 14,07}{0,603 \pm 0,095\%}$	
Ішемія-реперфузія		
Лімфобласти	$\frac{216 \pm 21,5^{**}}{1,687 \pm 0,175\%}$	$\frac{8,08 \pm 4,00}{0,073 \pm 0,038\%}$
Великі лімфоцити	$\frac{3323 \pm 84,1^*}{26,43 \pm 0,82\%^*}$	$\frac{285 \pm 27,4^*}{2,524 \pm 0,272\%}$
Середні лімфоцити	$\frac{6414 \pm 104^*}{48,01 \pm 0,78\%^{***}}$	$\frac{551 \pm 32,4}{4,332 \pm 0,264\%}$
Малі лімфоцити	$\frac{1977 \pm 94,7}{14,39 \pm 0,61\%}$	$\frac{252 \pm 24,8}{1,832 \pm 0,178\%^*}$
Апоптотичні клітини	$\frac{96,9 \pm 14,60}{0,716\% \pm 0,107}$	
Діабет		
Лімфобласти	$\frac{200,3 \pm 26,8^{**}}{1,673 \pm 0,226\%^*}$	$\frac{4,09 \pm 2,88}{0,036 \pm 0,025\%}$
Великі лімфоцити	$\frac{3029 \pm 112^{***}}{25,58 \pm 0,99\%^*}$	$\frac{384,3 \pm 28,7}{3,108 \pm 0,233\%}$
Середні лімфоцити	$\frac{5531 \pm 115^*}{46,35 \pm 0,93\%^*}$	$\frac{447,6 \pm 35,6^*}{3,660 \pm 0,289\%}$
Малі лімфоцити	$\frac{2093 \pm 89}{17,12 \pm 0,67\%^*}$	$\frac{210,5 \pm 25,4^*}{1,669 \pm 0,197\%^*}$
Апоптотичні клітини	$\frac{96,1 \pm 16,3}{0,753 \pm 0,127\%}$	
Діабет та ішемія-реперфузія		
Лімфобласти	$\frac{302 \pm 29,4^\wedge}{2,935 \pm 0,297\%^{\wedge\wedge}}$	$\frac{8,28 \pm 4,10}{0,072 \pm 0,036\%}$
Великі лімфоцити	$\frac{3509 \pm 109^\wedge}{31,96 \pm 1,23\%^{\wedge\wedge\wedge}}$	$\frac{238 \pm 24,1^{\wedge\wedge\wedge}}{2,087 \pm 0,204\%^{\wedge\wedge}}$
Середні лімфоцити	$\frac{5076 \pm 150^\wedge}{42,59 \pm 0,83\%^{\wedge}}$	$\frac{368 \pm 26,7^\wedge}{3,242 \pm 0,244\%}$
Малі лімфоцити	$\frac{1807 \pm 101^\wedge}{14,08 \pm 0,79\%^{\wedge}}$	$\frac{277 \pm 20,9^\wedge}{2,043 \pm 0,215\%}$
Апоптотичні клітини	$\frac{124 \pm 17,8}{0,869 \pm 0,127\%}$	

Примітка: в таблицях 2-3: у чисельнику – щільність клітин на 1 мм² залози, у знаменнику – відсоткове співвідношення тимоцитів різних класів

Таблиця 3

Структура лімфоїдної популяції у мозковій зоні тимуса контрольних щурів та тварин із цукровим діабетом після ішемії-реперфузії головного мозку (M±m)

Класи клітин лімфоїдної популяції	Нормальні клітини	Клітини з ознаками деструкції
Контроль		
Лімфобласти	<u>164,3±10,0</u> 1,431±0,190%	<u>15,40±1,06</u> 0,138±0,056%
Великі лімфоцити	<u>2754±93</u> 24,09±0,84%	<u>749,5±50,9</u> 6,563±0,468%
Середні лімфоцити	<u>4371±118</u> 37,38±0,82%	<u>1001±51</u> 8,539±0,473%
Малі лімфоцити	<u>1835±92</u> 15,57±0,72%	<u>513,3±38,7</u> 4,476±0,349%
Апоптотичні клітини	<u>151,4±22,2</u> 1,295±0,199%	
Ішемія-реперфузія		
Лімфобласти	<u>128±11,3*</u> 1,273±0,171%	<u>34,7±2,15***</u> 0,336±0,095%*
Великі лімфоцити	<u>2299±90,0**</u> 22,45±0,91%	<u>748±44,4</u> 7,344±0,457%
Середні лімфоцити	<u>3925±109*</u> 37,52±0,87%	<u>846±48,4*</u> 8,128±0,463%
Малі лімфоцити	<u>1698±80</u> 15,98±0,67%	<u>459±35,3</u> 4,299±0,326%
Апоптотичні клітини	<u>262±23,8*</u> 2,507±0,327%**	
Діабет		
Лімфобласти	<u>129,5±11,2*</u> 1,290±0,214%	<u>22,41±2,18</u> 0,230±0,091%
Великі лімфоцити	<u>2061±84***</u> 20,53±0,85%*	<u>502,9±39,0**</u> 5,015±0,393%*
Середні лімфоцити	<u>3620±112***</u> 34,90±0,82%*	<u>873,8±51,4*</u> 8,411±0,463%
Малі лімфоцити	<u>2196±86*</u> 21,54±0,79%***	<u>492,9±33,6</u> 4,781±0,305%
Апоптотичні клітини	<u>288,8±24,8***</u> 2,815±0,242%***	
Діабет та ішемія-реперфузія		
Лімфобласти	<u>139,5±12,0</u> 1,484±0,145% [^]	<u>22,90±1,68</u> 0,251±0,075%
Великі лімфоцити	<u>2387±73[^]</u> 24,33±0,80% ^{^^}	<u>614,3±38,1[^]</u> 6,356±0,410% [^]
Середні лімфоцити	<u>3715±109</u> 36,71±0,86%	<u>789,3±38,2</u> 7,869±0,375%
Малі лімфоцити	<u>1514±75^{^^^}</u> 14,54±0,61% ^{^^^}	<u>497,7±38,8</u> 4,928±0,382%
Апоптотичні клітини	<u>354,0±33,6</u> 3,285±0,295%	

ня всіх класів незмінених клітин до рівня, притаманного контрольним тваринам.

У мозковій зоні тимуса щурів контрольної групи після ішемії-реперфузії головного мозку виявлено зниження щільності незмінених лімфобластів, великих, середніх тимоцитів. Зросла також щільність апоптотичних клітин та деструктивних лімфобластів, що в цілому пояснює причини зниження щільності всіх класів тимоцитів.

У щурів із цукровим діабетом також мало місце зниження всіх класів тимоцитів, за винятком малих, щільність яких достовірно зростала. Щільність апоптотичних клітин зросла майже вдвічі стосовно контролю, що разом зі зниженням щільності деструктивних великих і середніх тимоцитів свідчить про прискорення апоптозу. Як і в кірковій, у мозковій зоні тимуса щурів із діабетом реакція тимоцитів на ішемію-реперфузію головного мозку була якісно іншою, ніж у контрольних тварин – тут виявлено зростання щільності великих нормальних та деструктивних тимоцитів при зниженні щільності малих. Отже, у мозковій зоні залози ішемія-реперфузія мозку у тварин контрольної групи та цукровий діабет посилюють апоптоз тимоцитів, однак за рахунок різних класів.

Аналіз відсоткового співвідношення різних класів тимоцитів у мозковій зоні залози показав відсутність перерозподілу після ішемії-реперфузії мозку в щурів контрольної групи, за винятком того, що зріс відсоток лімфобластів з ознаками деструкції. У тварин із цукровим діабетом виявлено зниження відсотка незмінених великих і середніх тимоцитів та деструктивних великих при зростанні відсотка малих незмінених клітин. Зріс також і відсоток апоптотичних тимоцитів. На відміну від щурів контрольної групи, у тварин із діабетом відбувся суттєвий перерозподіл незмінених клітин, який полягав у зростанні відсотка лімфобластів, великих і середніх тимоцитів та зниженні відсотка – малих. Також зріс відсоток великих деструктивних тимоцитів.

Сукупний аналіз отриманих результатів свідчить, що цукровий діабет суттєво модифікує зміни структури лімфоїдної популяції тимуса, які виникають у відповідь на ішемію-реперфузію головного мозку. Основною причиною цієї модифікації, на наш погляд, можна вважати порушений при довготривалому цукровому діабеті стан автотолерантності, на тлі якого моделювалася ішемія-реперфузія головного мозку.

Висновки

1. Цукровий діабет знижує сумарну щільність незмінених тимоцитів за рахунок лімфобластів, великих і середніх тимоцитів у кірковій та мозковій зонах тимуса. В останній зоні має місце підвищення щільності малих тимоцитів, яке, однак, не компенсує зниження щільності всіх інших класів лімфоїдних клітин.

2. У кірковій зоні залози неповна глобальна ішемія-реперфузія головного мозку в контрольних тварин знижує щільність менш зрілих клітин (лімфобластів та великих тимоцитів), підвищує щільність більш зрілих середніх і не впливає на щільність найбільш зрілих малих. У щурів із цукровим діабетом після даного втручання зростає щільність незрілих форм та знижується – більш зрілих середніх і малих тимоцитів.

3. У мозковій зоні тимуса контрольних щурів ішемія-реперфузія головного мозку знижує сумарну щільність незмінених клітин за рахунок усіх класів, крім малих тимоцитів, а в щурів із діабетом – підвищує щільність незрілих великих тимоцитів та знижує щільність малих.

Перспективи подальших досліджень

Для уточнення патогенезу виявлених змін планується дослідження експресії про- та антиапоптотичних білків p53 та Bcl-2 в різних класах тимоцитів.

Література

1. Алгоритм автоматичного аналізу лімфоїдної популяції тимуса / А.В.Абрамов, Ю.М.Колесник, В.А.Любомирская, А.М.Камышный // Вісник морфол. - 2002. - Т.8, №2. - С.261-262.
2. Аутоиммунные механизмы при ишемии / Н.Константинова, В.И.Скворцова, И.Еремин и [др.] // Аллергол. и иммунология. - 2005. - Т.6, №2. - С. 147-149.
3. Дисфункция β - клеток панкреатических островков у мужского потомства самок крыс с экспериментальным гестационным диабетом / Ю.М.Колесник, О.В.Ганчева, А.В.Абрамов, А.М.Камышный // Запорож. мед. журн. - 2007. - № 2. - С. 5-10.
4. Камышный А. М. Изучение процессов дифференцировки лимфоцитов тимуса и выраженности инсулита у крыс с экспериментальным сахарным диабетом / А.М.Камышный // Вісник проблем біол. і мед. - 2006. - № 2. - С. 99-101.
5. Структурно-функциональная организация лимфоидной популяции тимуса: опыт применения математического классификационного анализа / А.В. Абрамов, Ю.М. Колесник, В.А. Любомирская, А.М. Камышный // Клін. та експерим. патол.- 2002 - Т.1, №1.- С.5-9.
6. Эффекты многократного введения нейропептида Y на структуру лимфоидной популяции тимуса в норме и при экспериментальном сахарном диабете / А.В.Абрамов, А.М. Камышный, В.А.Любомирская, Ю.М.Колесник // Запорож. мед. журн. - 2003. - №5. - С.4-6.
7. Bach J. Immunotherapy of type 1 diabetes: lessons for other autoimmune diseases / J.Bach // Arthritis Res. - 2002. - Vol. 4. - P. 3-15.
8. Glymour M.M. Can Self-Reported Strokes Be Used to Study Stroke Incidence and Risk Factors? / M.M.Glymour, M.Avendano // Stroke.- 2009. - Vol.40, №3. - P.873-879.
9. Importance of a thymus dysfunction in the pathophysiology of type 1 diabetes / V.Geenen, F.Brilot, C.Louis [et al.] // Rev. Med. Liege. - 2005. - Vol. 60. - P. 291-296.

10. Prevention of type 1 diabetes: the time has come / J.Sherr, J.Sosenko, J.Skyler, K.Herold // Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab. - 2008. - Vol. 6. - P. 334-343.
11. Stadinski B. Molecular targeting of islet autoantigens / B.Stadinski, J.Kappler, G.S.Eisenbarth // Immunity. - 2010. Vol.32, № 4. - С. 446-56.
12. Staeva-Vieira T. Translational mini-review series on type 1 diabetes: immune-based therapeutic approaches for type 1 diabetes / T.Staeva-Vieira, M.Peakman, M.Herrath // J. Clin. Exp. Immunol. - 2007. - Vol. 148. - P. 17-31.
13. Trucco M. Immunoregulatory dendritic cells to prevent and reverse new-onset type 1 diabetes mellitus / M.Trucco, N.Giannoukakis // Expert Opin. Biol. Ther. - 2007. - Vol. 7. - P. 951-963.
14. Ultrastructure of the thymus in diabetes mellitus and starvation / C.Elmas, D.Erdogan, G.Take [et al.] // Adv. Ther. - 2008. - Vol. 25, №1. - P. 67-76.

**СТРУКТУРА ЛИМФОИДНОЙ ПОПУЛЯЦИИ
ТИМУСА КРЫС СО СТРЕПТОЗОТОЦИН-
ИНДУЦИРОВАННЫМ САХАРНЫМ ДИА-
БЕТОМ, ОСЛОЖНЕННЫМ ИШЕМИЧЕСКИ-
РЕПЕРFUЗИОННЫМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ
ГОЛОВНОГО МОЗГА**

Ткачук А.В.

Резюме. Изучено влияние неполной глобальной ишемии-реперфузии головного мозга на структуру лимфоидной популяции тимуса у самцов крыс с четырехмесячным сахарным диабетом. Показано, что данное вмешательство в корковой зоне тимуса контрольных крыс снижает плотность распределения незрелых клеток и повышает плотность более зрелых классов тимоцитов, а у животных с сахарным диабетом – имеет обратные эффекты на плотность незрелых и более зрелых классов клеток. В мозговой зоне тимуса контрольных крыс ишемия-реперфузия головного мозга уменьшает суммарную плотность неизмененных клеток за счет всех классов, кроме малых тимоцитов, а у крыс

с диабетом – повышает плотность незрелых больших тимоцитов и снижает – наиболее зрелых.

Ключевые слова: сахарный диабет, ишемия-реперфузия головного мозга, тимоциты.

**STRUCTURE OF THE LYMPHOID POPULATION OF
THYMUS RATS WITH STREPTOZOTOCIN-INDUCED
DIABETES, COMPLICATED WITH ISCHEMIA-
REPERFUSION INJURY BRAIN**

A.V. Tkachuk

Abstract. The effect of incomplete global ischemia-reperfusion of the brain on the structure of the lymphoid population of the thymus in male rats with a four-month diabetes mellitus has been studied. It has been shown that this interference in the cortical zone of thymus of control rats reduces the density of immature cells and increases the density of more mature thymocytes classes, and in animals with diabetes – has the opposite effect on the density of immature and more mature classes of cells. In the medullary zone of the thymus of control rats ischemia-reperfusion of the brain reduces the total density of the unaltered cells from all classes, except for small thymocytes, and in rats with diabetes - increases the density of immature thymocytes and reduces the large – the most mature.

Key words: diabetes mellitus, ischemia-reperfusion of the brain, thymocytes.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Clin. and expir. pathol. - 2011. - Vol.10, №3 (37).-P.133-138

*Надійшла до редакції 17.08.2011
Рецензент – проф. В.Ф.Мислицький*

© Ткачук О.В., 2011