

УДК 612.617:611.068:[618.3-06:616.36-008-811.6]-092.9

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ СЕМЕННИКОВ КРЫС ВТОРОГО ПОКОЛЕНИЯ, ПОЛУЧЕННОГО ОТ САМОК, РАЗВИВАВШИХСЯ В УСЛОВИЯХ ХОЛЕСТАЗА МАТЕРИ

© **Мацюк Я.Р., Вороник Ю.Н., Михальчук Е.Ч.**

Гродненский государственный медицинский университет, Республика Беларусь, 230023, Гродно, ул. Большая Троицкая, 4

Резюме

Холестаз – нарушение синтеза, секреции и оттока желчи. Данная патология нередко возникает у беременных и отягощает течение беременности и родов. В результате ранее проведенных экспериментов было установлено весьма негативное влияние холестаза беременных на семенники потомства, развивавшегося в условиях данной патологии.

Цель. Изучение особенностей семенников беспородных белых крыс второго поколения, родившегося от самок первого поколения, развивавшихся непосредственно в условиях экспериментально моделируемого у матери на 17-е сут. беременности подпеченочного обтурационного холестаза.

Методика. Гистологическое и морфометрическое исследование семенников второго поколения беспородных белых крыс с последующим статистическим анализом.

Результаты. Установлена задержка физического развития животных второго поколения, сопровождаемая выраженными структурными нарушениями в семенниках, оказывающими неблагоприятное воздействие на сперматогенез.

Заключение. Изменения, выявленные в семенниках потомства второго поколения, аналогичны тем, что имели место у самцов, развивавшихся непосредственно в условиях холестаза матери.

Ключевые слова: потомство, семенники, холестаз, крысы

AGE FEATURES OF TESTES STRUCTURE OF THE SECOND GENERATION RATS, OBTAINED FROM FEMALE RATS, DEVELOPED IN CHOLESTASIS OF THEIR MOTHER

Macjuk Ja.R., Voronik Ju.N., Mihal'chuk E.Ch.

Grodno State Medical University, 4, Bolshaya Troitskaya St., Grodno, 230023, Republic of Belarus

Abstract

Cholestasis is a disturbance of synthesis, secretion and outflow of bile. This pathology often occurs in pregnant women and burdens the course of pregnancy and childbirth. As a result of the previous experiments, rather negative effect of cholestasis of pregnant women on the testes of their offspring developed in this pathology was revealed.

Objective. The aim of the study was to analyze the features of the testes of the second generation outbred white rats, born from the first-generation females, developed directly during subhepatic obturation cholestasis experimentally modeled on the 17th day of their pregnancy.

Methods. The histological and morphometric methods of investigation of testes of outbred white rats with subsequent statistical analysis were used.

Results. In the course of the study, a delay in the physical development of the second-generation animals was established, accompanied by severe structural disturbances in the testes that had an adverse effect on spermatogenesis.

Conclusion. The changes revealed in the testes of second-generation offspring are similar to those that occurred in males that developed directly in the mother's cholestasis.

Keywords: offspring, testes, cholestasis, rats

Введение

Неблагоприятное воздействие холестаза на взрослый организм и родившееся потомство доказано экспериментально и клинически [3, 4, 6, 11]. Вызывает интерес проявление этого воздействия и у потомства второго поколения, полученного от спаривания животных, развивающихся в условиях холестаза матери (первое поколение) с животными, выращенными в обычных условиях вивария [5, 7, 8]. При этом экспериментально установлено, что особенности физического развития, морфогенеза у потомства второго поколения идентичны тем, что имели место у первого, развивавшегося непосредственно в условиях холестаза матери. Однако исследования такого плана единичны, а выявленные изменения в разных органах не однозначны, что требует дальнейших исследований. Не установлена зависимость выявленных нарушений от пола опытных животных, развивавшихся в условиях холестаза.

Затронутые выше вопросы имеют не только научную, но прикладную и социальную значимость, так как известно, что причины заболеваемости в подростковом и зрелом возрасте закладываются в раннем онтогенезе [12, 13]. Исходя из вышеизложенного, была поставлена цель: изучить возрастные особенности структуры семенников крыс второго поколения, полученного при спаривании самок, развивавшихся в условиях холестаза матери, с обычными самцами.

Методика

Исследования проведены на 48 крысах-самцах второго поколения. Из них 27 животных, полученных от спаривания 7 самок первого поколения (развивавшихся в условиях холестаза у матери, экспериментально моделируемого на 17-е сут. беременности) с обычными самцами, составили опытную группу. Другие 19 крыс-самцов, полученных при спаривании самок с самцами, развивавшимися в обычных условиях, составили контрольную группу. Экспериментальные животные, как и полученное от них потомство, в разные сроки постнатального онтогенеза находились в одинаковых условиях вивария со свободным доступом к воде и пище под тщательным наблюдением. При постановке эксперимента соблюдались требования гуманного обращения с лабораторными животными.

По достижении крысами-самцами опытной и контрольной групп 15-, 45- и 90-суточного возраста из каждого помета забирали по 1-3 крысенка. После взвешивания и легкого эфирного наркоза у них извлекались семенники и со срединной их части забирали материал, который после фиксации в жидкости Карнуа заключали в парафин по принципу «контроль-опыт». Изготовленные на микротоме «Leica PM 2125 RTS» одномоментно из материала контрольных и опытных животных парафиновые срезы толщиной 5 мкм, после окраски гематоксилином и эозином использовали для гистологических и морфометрических исследований. Для проведения последних нами был разработан комплекс параметров, дающих возможность объективно определить даже малейшие изменения в структуре семенников у опытных животных. В семенниках в поле зрения (ув. 400) определялись следующие параметры: число интерстициальных клеток, количество вокруг извитых канальцев перитубулярных кровеносных капилляров (ув. 400), число извитых семенных канальцев (ув. 200), количественный и качественный состав в них сперматогенных и поддерживающих клеток с определением их структурных особенностей (ув. 400).

Изучение гистологических препаратов, проведение морфометрических исследований осуществляли с использованием микроскопа Axioscop 2 plus (Zeiss, Германия), оснащенного цифровой камерой Leica DFC 320 (Leica Mikrosistems Германия) и программы Image Warp (Bit. Flow, USA). Данные размеров структур выражали в микрометрах (мкм). Иллюстративный материал получали с помощью микроскопа Axioscop 2 plus (Zeiss, Германия) со встроенной видеокамерой Axio Cam mcs 5 vision Gmb H (Zeiss, Германия) при различных увеличениях объектива.

Полученный в результате проведенных морфометрических исследований цифровой материал подвергался параметрической статистической обработке с применением пакета программы «Statistica 6» для Windows.

Результаты исследования

Опытные 15-суточные крысы, полученные от самок, развивавшихся в условиях холестаза матери, отличались меньшей массой, малой подвижностью и задержкой физического развития, что проявлялось и более поздним опусканием семенников по сравнению с контролем [6, 9]. Размеры,

как и показатели абсолютных масс семенников в опытной группе, были достоверно ниже, чем в контроле ($0,06 \pm 0,01$ г при $0,36 \pm 0,02$ г в контроле $p < 0,01$). Большая часть семенных канальцев у опытных животных в сравнении с контролем отличалась прямолинейным ходом. Расположенная между канальцами интерстициальная ткань отечная (рис. А). Количество в ней интерстициальных клеток на поле зрения (ув. 400), в сравнении с контролем, увеличено (табл.), что свидетельствует о задержке их инволюции в послеродовом периоде. Они отличались маленькими размерами, преимущественно округлых или отростчатых форм, сниженными оксифильными свойствами цитоплазмы, иногда подверженной микровакуолизации. Эти клетки, как правило, располагались поодиночке, а иногда в виде конгломерата вблизи сосудов мелкого калибра.

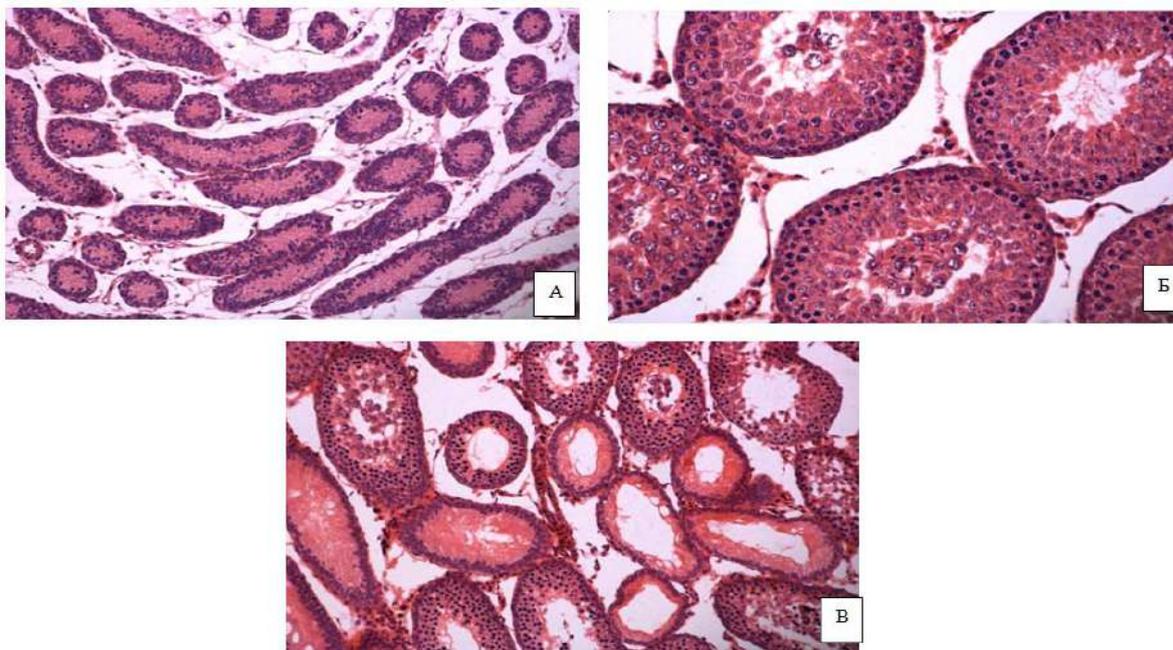


Рис. Общий вид фрагментов семенников крыс второго поколения, родившихся от самок, развивавшихся в условиях холестаза у матери. А – Общий вид семенных канальцев, отечность межканальцевой стромы и групповое расположение интерстициальных клеток (указано стрелками) в семенниках 15-суточных опытных крыс, ув. 100. Б – Извитые семенные канальцы 45-суточной опытной крысы. В просвете канальцев видны отделившиеся сперматогенные клетки, подвергающиеся деструктивным изменениям, ув. 400. В – Отсутствие сперматогенных клеток, различные деструктивные изменения в семенных канальцах у 45-суточной опытной крысы, ув. 200. Окраска гематоксилином и эозином

Количество выявляемых вокруг семенных канальцев перитубулярных кровеносных капилляров снижено. Они, как правило, имели малый просвет (табл.). Семенные канальцы отличались меньшей толщиной эпителиосперматогенного слоя, а в нем и меньшим числом ярусов сперматогенных клеток. Среди последних преобладали сперматогонии. Однако их количество на поперечном срезе извитого семенного канальца, в сравнении с контролем, было заметно меньшим, несмотря на то, что диаметр их ядер находился в пределах нормы. Сперматоциты первого порядка обнаруживались крайне редко и далеко не во всех канальцах. Сперматоциты второго порядка в этот срок постнатального развития не выявлялись даже в семенных канальцах животных контрольной группы.

Реже обнаруживались в извитых семенных канальцах и поддерживающие клетки (табл.). Их цитоплазма отличалась сниженными оксифильными свойствами. Иногда в ней, особенно в базальном отделе, обнаруживались явления микро- и даже макровакуолизации. Хроматин ядер становился крупноглыбчатым с периферическим расположением. Ядрышки выделялись отчетливо, но, как правило, занимали центральное положение.

На 45-е сут. постнатального развития абсолютная масса опытных крыс, как и контрольных, резко возрастала, но продолжала находиться на нижней границе нормы. Возрастала и абсолютная масса семенников, но продолжала оставаться достоверно сниженной в сравнении с контролем ($0,73 \pm 0,14$ г при $1,55 \pm 0,15$ г в контроле, $p < 0,05$).

Таблица. Морфометрические показатели семенников крыс второго поколения, родившегося от самок, развивавшихся в условиях холестаза матери, (M±m)

Показатели	15-е сут.		45-е сут.		90-е сут.	
	К	О	К	О	К	О
Количество интерстициальных клеток в поле зрения (ув. 400), штук	2,62± 0,14	6,20± 0,76**	6,25± 0,30	3,82± 0,89**	6,78± 0,18	4,97± 0,71**
Диаметр ядер интерстициальных клеток, мкм	4,52± 0,27	4,91± 0,38	5,71± 0,69	4,84± 0,35	6,10± 0,12	4,91± 0,36**
Количество перитубулярных гемокапилляров (ув. 400), штук	3,79± 0,60	2,59± 0,39**	3,69± 0,24	1,80± 0,65**	4,55± 0,92	3,33± 0,49*
Диаметр просвета перитубулярных гемокапилляров, мкм	4,96± 0,67	3,40± 0,23**	8,20± 0,73	3,22± 0,46**	5,83± 0,62	4,04± 0,55**
Количество извитых семенных канальцев в поле зрения (ув. 200), штук	45,38± 1,88	40,10± 2,32**	8,56± 1,16	12,32± 2,09*	5,44± 0,43	6,46± 0,64*
Диаметр извитых семенных канальцев, мкм	57,58± 2,06	43,62± 3,14**	158,33± 11,06	123,89± 9,76**	208,75± 3,70	175,75± 12,11**
Диаметр просвета извитых семенных канальцев, мкм	2,13± 0,63	1,20± 1,44	55,00± 4,71	45,67± 4,35*	69,50± 15,32	41,74± 14,52*
Толщина эпителиосперматогенного слоя, мкм	19,10± 2,36	11,15± 0,96**	48,58± 2,70	36,20± 1,92**	71,67± 1,36	51,60± 6,01
Количество слоёв сперматогенных клеток, штук	2,23± 0,11	2,07± 0,30	5,49± 0,46	4,45± 0,86	5,79± 0,33	4,79± 0,62*
Количество сперматогоний в канальце, штук	32,75± 1,17	24,48± 1,58**	59,25± 4,44	48,42± 4,19*	76,67± 3,60	58,17± 3,30**
Число рядов сперматогоний в канальце, штук	2,08± 0,20	1,75± 0,02**	1,41± 0,27	1,15± 0,13	1,38± 0,13	1,18± 0,10*
Диаметр ядер сперматогоний, мкм	4,58± 0,15	4,94± 0,40	5,47± 0,31	4,67± 0,38*	6,00± 0,20	5,39± 0,37*
Количество сперматоцитов I порядка в канальце, штук	3,60± 0,28	1,16± 0,50	44,50± 1,64	44,50± 1,75	58,92± 2,33	42,40± 7,10
Число рядов сперматоцитов I порядка в канальце, штук	0,48± 0,10	0,32± 0,16	1,59± 0,07	1,65± 0,25	1,35± 0,12	1,29± 0,21
Диаметр ядер сперматоцитов I порядка, мкм	6,38± 0,28	6,04± 0,22	6,65± 0,10	6,21± 0,28*	6,81± 0,31	6,32± 0,29*
Количество сперматоцитов II порядка в канальце, штук	-	-	50,29± 5,81	42,50± 2,01	73,56± 12,42	69,93± 3,73
Число рядов сперматоцитов II порядка в канальце, штук	-	-	2,05± 0,54	1,69± 0,24	3,00± 0,35	2,30± 0,37
Диаметр ядер сперматоцитов II порядка, мкм	-	-	5,50± 0,35	5,10± 0,45	6,00± 0,29	5,35± 0,34*
Количество клеток Сертоли в канальце, штук	5,20± 0,16	4,30± 0,60*	5,70± 0,58	4,88± 0,22*	6,31± 0,24	6,22± 0,33
Диаметр ядер клеток Сертоли, мкм	6,48± 0,10	6,03± 0,31*	6,70± 0,12	6,33± 0,22*	6,99± 0,30	6,25± 0,18*

Примечание: * – p<0,05; ** – p<0,01 при сравнении групп О и К

Сохранялась отечность межканальцевой соединительнотканной стромы (рис. Б). Количество в ней интерстициальных клеток снижалось, и было уже почти в два раза меньше, в сравнении с контрольными животными. Уменьшался и размер их ядер (таблица). Несмотря на малые размеры, они отличались полиморфизмом, сниженными оксифильными свойствами цитоплазмы с явлениями микровакуализации. Статистически достоверно уменьшено число перитубулярных кровеносных капилляров. Встречались канальцы, вокруг которых последние не обнаруживались. Просвет перитубулярных кровеносных капилляров продолжал быть суженным. Число на поле зрения семенных канальцев, в виду сужения их диаметров, было больше, чем в контроле. Однако толщина в них эпителиосперматогенного слоя меньшая, чем у животных контрольной группы (табл.). Последнее происходило за счет уменьшения в них содержания в первую очередь сперматогоний, которые занимали в канальце уже один ряд. Число в канальце сперматоцитов первого порядка достигало уровня контрольных животных, а сперматоцитов второго порядка, сперматид было сниженным. Между тем, нередко в семенниках опытных животных встречались канальцы лишённые эпителиосперматогенного слоя, или канальцы, содержащие в небольшом

количестве сперматогонии (рис. В). Между ними располагались поддерживающие клетки, цитоплазма которых, особенно в базальном отделе, подвержена явлению микро- и макровакуолизации. Встречались семенные канальцы, просвет которых занят отслоившимися от эпителиосперматогенного слоя сперматогенными клетками, находящимися на разных уровнях развития. Последние подвергались деструкции, вплоть до некротических изменений (рис. Б). Оставалось сниженным в семенных канальцах и число поддерживающих клеток.

На 90-е сут. у животных опытной группы отечность межканальцевой соединительнотканной стромы сохранялась. Численная плотность в ней интерстициальных клеток оставалась сниженной (таблица). Они были, как правило, малых размеров, но продолжали отличаться полиморфизмом, имели преимущественно отросчатую форму. Ядра интерстициальных клеток уменьшены в размере, хроматин крупноглыбчатый, ядрышки неотчетливы, оксифильные свойства цитоплазмы снижены, нередко она подвержена явлению микровакуолизации. Сужен просвет перитубулярных кровеносных капилляров, а также уменьшено их число, по сравнению с контрольной группой (табл.).

Семенные канальцы с прямолинейным ходом встречались реже, чем в предыдущие сроки. Однако они имели более узкий диаметр, в связи с чем их количество на поле зрения было больше, нежели у животных контрольной группы. Заметно снижена в таких канальцах толщина эпителиосперматогенного слоя, а в нем и число ярусов сперматогенных клеток. Это происходит за счет уменьшения количества сперматогоний, сперматоцитов первого и второго порядка. Уменьшен и размер их ядер. Незначительно сниженным остается, как и в предыдущие сроки, и число поддерживающих клеток (табл.).

Обсуждение результатов исследования

Подытоживая результаты исследований, можно, что у самцов крыс второго поколения, рождённых самками, развивавшихся в условиях холестаза у матери, имеет место задержка физического развития и становления структурных свойств их семенников, оказывающих неблагоприятное воздействие на процесс сперматогенеза. Вызывает интерес тот факт, что выявленные при этом неспецифические изменения в семенниках: отечность межканальцевой стромы, задержка в ранние сроки после рождения инволюции интерстициальных клеток, прямолинейность семенных канальцев, суженность их диаметра, в виду уменьшения в них ширины эпителиосперматогенного слоя и численности в нём сперматогенных клеток, сопровождаемых развитием в них деструктивных изменений, идентичны по своему характеру тем, что наблюдались в семенниках крыс первого поколения, развивавшихся в условиях экспериментально моделируемого холестаза [4, 6]. Они схожи по большинству морфометрических показателей.

Патогенетический механизм этих изменений довольно сложный. Можем предположить, что у потомства первого поколения, на которое воздействовали продукты эндогенной интоксикации, имеющие место при холестазе, особенно со стороны желчных кислот, количество которых резко возрастает у матери и у плода [2, 13], развиваются не только вышеуказанные структурные изменения в семенниках, но, вероятно, происходят нарушения в геноме половых клеток, наследственно передающихся второму поколению. В целом надо отметить, что исследований такого плана в доступной литературе не найдено. Имеются лишь единичные данные о неблагоприятном воздействии хронических поражений печени различного генеза на семенники потомства крыс [1, 10].

Заключение

У потомства крыс, рождённого матерями с экспериментально выполненным холестазом беременных, имеет место не только задержка физического развития, но и становление структурных свойств их семенников, что неблагоприятно воздействует на сперматогенез. Эти изменения идентичны тем, что наблюдались у крыс-самцов, непосредственно развивавшихся в условиях холестаза у матери.

Литература (references)

1. Брюхин Г.В., Сизоненко М.Л. Характеристика клеток Лейдига у новорожденного потомства самок крыс с хроническим поражением гепатобилиарной системы различного генеза // Журнал Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2015. – №1 – С. 76-79. [Brjihin G.V., Sizonenko M.L. Zhurnal

- Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja terapija*. Journal of Pathological Physiology and Experimental Therapy. – 2015. – N1 – P. 76-79. (in Russian)]
2. Кизюкевич Л.С., Кузнецов О.Е., Гуляй И.Э. Состояние тканевого гомеостаза почечной паренхимы через 72 часа от начала моделирования внепеченочного обтурационного холестаза // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2011. – №1. – С. 42-45. [Kizyukevich LS, Kuznetsov OE, Gulyai IE *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*. Journal of the Grodno State Medical University. – 2011. – N1. – P. 42-45. (in Russian)]
 3. Кизюкевич Л.С., Мацюк Я.Р. Экстрапеченочный холестаз матери и развитие организма потомства // Педиатрия. – 2002. – №2. – С. 75-78. [Kizyukevich L.S, Matsyuk Ya.R. *Pediatrija*. Pediatrics. – 2002. – N2. – P. 75-78. (in Russian)]
 4. Мацюк Я.Р., Барабан О.В., Емельянчик С.В. Неблагоприятные воздействия холестаза беременных, вызванного в период фетогенеза, на морфофункциональные свойства семенников родившегося потомства // Вести Национальной академии наук Беларуси. – 2010. – №1. – С. 11-17. [Matsyuk Ya.R., Baraban O.V., Emelyanchik S.V. *Vesti Nacional'noj akademii nauk Belarusi*. News of the National Academy of Sciences of Belarus. – 2010. – N1. – P. 11-17. (in Russian)]
 5. Мацюк Я.Р., Вороник Ю.Н. Структурно-цитохимические особенности органов женской половой системы 15- и 45-суточных крыс-самок, родившихся от самцов, развивавшихся в условиях холестаза матери // Новости медико-биологических наук. – 2017. – Т.15, №2. – С. 46-50. [Matsyuk Ya.R., Voronik Yu.N. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk*. News of biomedical sciences. – 2017. – T.15, N2. – P. 46-50. (in Russian)]
 6. Мацюк Я.Р., Михальчук Е.Ч., Кизюкевич Л.С. Структура семенников крыс, развивавшихся в условиях холестаза у матери, особенности их репродуктивных характеристик и развитие потомства // Морфология. – 2017. – Т.151, №3. – С. 76-82. [Matsyuk Ya.R., Michalchuk E.C., Kizyukevich LS *Morfologija*. Morphology. – 2017. – T.151, N3. – P. 76-82. (in Russian)]
 7. Мацюк Я.Р., Михальчук Е.Ч., Шишко В.В. Морфофункциональные особенности желудка 2- и 15-дневных крысят, родившихся от самцов, развивавшихся в условиях холестаза матери // Новости медико-биологических наук. – 2017. – Т.15, №1. – С. 43-48. [Matsyuk Ya.R., Mikhalchuk E.C., Shishko V.V. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk*. News of biomedical sciences. – 2017. – T.15, N1. – P. 43-48. (in Russian)]
 8. Михальчук Е.Ч., Мацюк Я.Р. Репродуктивная способность самок белых крыс, развивавшихся в условиях холестаза матери и особенности развития потомства, родившегося от них // Новости медико-биологических наук. – 2017. – Т.15, №2. – С. 31-34. [Mikhalchuk E.C., Matsyuk Ya.R. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk*. News of biomedical sciences. – 2017. – T.15, N2. – P. 31-34. (in Russian)]
 9. Михальчук Е.Ч., Мацюк Я.Р. Репродуктивная способность самок белых крыс, развивавшихся в условиях холестаза матери и особенности развития потомства родившегося от них // Новости медико-биологических наук. – 2017. – Т.15, №2. – С. 46-50. [Mikhalchuk E.C., Matsyuk Ya.R. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk*. News of biomedical sciences. – 2017. – T.15, N2. – P. 46-50. (in Russian)]
 10. Сизоненко М.Л. Морфофункциональная характеристика семенников потомства самок крыс с хроническим поражением гепатобилиарной системы разного генеза: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – О., 2006. – 22 с. [Sizonenko M.L. *Morfofunkcional'naja harakteristika semennikov potomstva samok krys s hronicheskim porazheniem hepatobiliarnoj sistemy raznogo geneza (kand. dis.)*. Morphofunctional characteristics of the testes of the offspring of female rats with chronic lesions of the hepatobiliary system of different genesis (Author's Abstract of Candidate Thesis). – Orenburg, 2006. – 22p. (in Russian)]
 11. Шумскене Й., Купчинскас Л., Кондракене Ю. Гепатологические и акушерские аспекты внутрипеченочного холестаза беременных // Гастробюллетень. – 2001. – №1. – С. 12-14. [Shumskene J., Kupchinskask L., Kondrackene Ju. *Gastrobjulleten'*. GastroBulletin. – 2001. – N1. – P. 12-14. (in Russian)]
 12. Barker D.J. The malnourished baby and infant // British Medical Bulletin. – 2001. – V.60. – P. 69-88.
 13. Fowden A.L, Giussani D.A, Forhead A.J. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences // Physiology. – 2006. – V.21. – P. 29-37.

Информация об авторах

Мацюк Ярослав Романович – доктор биологических наук, профессор кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Гродненского государственного медицинского университета. Республика Беларусь. E-mail: matsyuk39@mail.ru

Вороник Юлия Николаевна – кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Гродненского государственного медицинского университета. Республика Беларусь. E-mail: Julia_nikol@mail.ru

Михальчук Елена Чеславовна – кандидат биологических наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Гродненского государственного медицинского университета. Республика Беларусь. E-mail: milena6519@mail.ru