

УДК 611.24:591.461.4:615.849.19

МОРФОЛОГИЯ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ЛАЗЕРНЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ В КРАСНОМ ДИАПАЗОНЕТ.Л.Огородникова¹, Н.П.Красавина¹, С.С.Целуйко¹, С.Д.Чжоу², Ц.Ли²¹Амурская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения РФ,
675000, г. Благовещенск, ул. Горького, 95²Вторая госпитальная клиника Чунцинского медицинского университета, КНР,
400010, г. Чунцин, ул. Линьцзян, 76**РЕЗЮМЕ**

Цель исследования заключалась в оценке морфологических и популяционных изменений макрофагов легких при действии лазерного излучения в красном диапазоне. Экспериментальные исследования проводили на кратковременной культуре макрофагов легких беспородных белых крыс. Бронхоальвеолярная жидкость для экспериментальных исследований забиралась у животных в стандартных условиях, затем ее вносили в микрокамеры и центрифугировали при 800 оборотах в течение 5 минут, для получения монослоя клеток. На полученный монослой макрофагов воздействовали лазером длиной волны 0,63 мкм в дозе 0,2 Дж/см². Макрофаги первой группы не подвергались облучению; макрофаги второй группы облучали красным лазером в дозе 0,2 Дж/см², макрофаги третьей группы облучали красным лазером в дозе 0,2 Дж/см² и инкубировали в культуральной среде с добавлением эмоксипина. При помощи трансмиссионного электронного микроскопа изучали наиболее информативные показатели макрофагов – площадь, длину, ширину и округлость клеток. В результате исследования были установлены морфометрические критерии, позволившие объективно оценить реакцию макрофагов легких в кратковременной культуре и на основе количественного анализа выделить группы малых, средних и крупных клеток. Действие красного лазера в дозе Дж/см² приводило к изменениям морфологии, количественных характеристик и популяционного состава макрофагов легких, число крупных клеток при облучении возрастало в 4,5 раза, изменялось большинство количественных показателей, выявлялись деструктивные изменения митохондрий. Добавление в инкубационную среду эмоксипина при облучении макрофагов красным лазером привело к уменьшению дегенеративных изменений в цитоплазме клеток, снижая таким образом побочные эффекты лазерного излучения в красном диапазоне при облучении в дозе 0,2 Дж/см².

Ключевые слова: макрофаги, кратковременная культура клеток, лазерное излучение, морфометрия.

SUMMARY**MORPHOLOGY OF ALVEOLAR MACROPHAGES UNDER EXPERIMENTAL EXPOSURE TO LASER RADIATION IN THE RED RANGE**T.L.Ogorodnikova¹, N.P.Krasavina¹, S.S.Tseluyko¹, X.D.Zhou², Q.Li²¹Amur State Medical Academy, 95 Gor'kogo Str.,
Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation²The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, 76 Linjiang Road, Chongqing, 400010, China

The aim of the research was to estimate morphological and population changes of lungs macrophages under exposure to laser radiation in the red range. Experimental studies were done on a short-term culture of lungs macrophages of white outbred rats. Epithelial fluid for experimental studies was taken from animals in standard conditions, and then it was put into microchambers and centrifuged under 800 revs during 5 minutes to obtain the monolayer of cells. The obtained macrophages monolayer was acted upon with laser of 0.63 mkm wave length in the dose of 0.2 J/sm². Macrophages of the first group were not exposed to laser irradiation; macrophages of the second group were radiated with the red laser in the dose of 0.2 J/sm²; macrophages of the third group were radiated with the red laser in the dose of 0.2 J/sm² and incubated in the culture medium with Emoxipine addition. With the help of transmission electron microscope the most informative parameters of macrophages were studied, namely: the square, the length, the width and cells circularity. As a result of the study morphometric criteria were identified; they allowed to estimate objectively the response of lungs macrophages in a short-term culture and to identify the groups of small, medium and big cells with the quantitative analysis. The exposure to red laser in the dose of J/sm² led to the changes in morphology, quantitative characteristics and the population composition of lungs macrophages; the number of big cells under radiation was 4.5 times more, the majority of quantitative parameters changed, destructive changes of mitochondria were revealed. Emoxipine addition to the incubation medium under exposure of macrophages to radiation with red laser resulted in the decrease of degenerative changes in cells cytoplasm, decreasing the side effects of laser in the red range under the radiation of 0.2 J/sm².

Key words: macrophages, short timed culture of cells, red laser radiation, morphometry.

Как известно, биологические эффекты низкоинтенсивного лазерного излучения реализуются на клеточном уровне [2, 5, 14]. Предполагается, что фотоакцептором для красного лазера служат цитохромы дыхательной цепи, локализованные в митохонд-

риальной мембране, поэтому именно митохондрии являются наиболее чувствительными к действию красного излучения [7, 12]. По данным ряда авторов, взаимодействие данного акцептора с квантом красного спектра излучения переводит систему мононуклеарных фагоцитов в особые режимы функционирования, и эти эффекты отмечаются как *in vivo*, так и *in vitro*. Однако единой теории, объясняющей механизм действия лазера на клетки, на сегодняшний день нет. Также неизвестно, в какой степени различаются реакции макрофагов на воздействия, при которых происходит прямое стимулирование системы мононуклеарных фагоцитов [4, 9, 10, 11, 15]. Наряду с положительными изменениями, возникающими в различных системах организма в условиях лазерного облучения, обнаружен и отрицательный аспект воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения на клетки.

Считают, что конечный эффект лазерного излучения определяют длина волны и доза. В морфологических исследованиях было выделено три дозовых порога. Первый – минимальные дозы, которые вызывают образование внутриклеточных структур и пролиферацию клеток. Второй порог – оптимальные дозы, которые ведут к усилению морфообразовательных процессов, ускорению пролиферации и дифференциации клеток. Третий – предельные дозы, превышение которых тормозит перечисленные процессы [1].

Лазерное излучение, наряду с положительным влиянием, может оказывать прооксидантный эффект, а метилэтилпиридинол (Эмоксипин®), в свою очередь, является достаточно эффективным антирадикальным ингибитором, способным в 1,5-2 раза увеличить антиокислительную активность липидов уже при однократном применении, что позволяет предположить наличие у него антирадикальных свойств. Поскольку в литературе имеются противоречивые данные о роли лазерного излучения в стимуляции биологических процессов, этот вопрос на сегодняшний день считается нерешенным.

Не вызывает сомнений то, что популяция мононуклеарных фагоцитов морфологически и функционально неоднородна [3, 6, 8, 13], однако вопрос о гетерогенности мононуклеарных фагоцитов далек от окончательного разрешения. Изучение влияния лазера на процессы, происходящие в клетках, с применением морфологических и морфометрических методов анализа предпринимались редко. Все вышесказанное послужило основой для проведения нашего исследования, целью которого было получение данных об изменениях макрофагов легких при действии на них лазерного излучения в красном диапазоне в условиях *in vitro* и при наличии эмоксипина в инкубационной среде, что, в свою очередь, может дополнить современные представления о мононуклеарных фагоцитах, их пластичности и способности изменяться при воздействии разнообразных факторов, которые обуславливают их гетерогенность.

Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования проводили на

кратковременной культуре макрофагов легких 30 беспородных белых крыс. Протокол экспериментальной части исследования на этапах содержания животных, моделирования патологических процессов и выведения их из опыта соответствовал принципам биологической этики, изложенным в Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985), Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986), Приказе МЗ СССР №755 от 12.08.1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных», Приказе МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». При завершении исследований выведение животных из опыта проводили путем декапитации с соблюдением требований гуманности согласно Приложению №4 «О порядке проведения эвтаназии умерщвления животного» к Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных (приложение к Приказу МЗ СССР №755 от 12.08.1977 г.). Исследование одобрено Этическим комитетом Амурской государственной медицинской академии.

Бронхоальвеолярная жидкость для экспериментальных исследований забиралась у животных в стандартных условиях, затем ее вносили в микрокамеры и центрифугировали при 800 оборотах в течение 5 минут для получения монослоя клеток. Отделяли макрофаги от других клеточных элементов, промывая их средой 199. Источником лазерного излучения служил аппарат лазерной терапии Мустанг (Россия) с длиной волны 0,63 мкм (красный лазер). На полученный монослой макрофагов воздействовали лазером, затем инкубировали в питательной среде 199 в течение трех часов при температуре 37°C. Макрофаги легких крыс 1 (контрольной группы (n=10) не подвергались облучению; макрофаги 2 группы (n=10) облучали красным лазером в дозе 0,2 Дж/см², к макрофагам 3 группы экспериментальных животных (n=10) после воздействия лазером добавляли эмоксипин и инкубировали в культуральной среде. Препараты кратковременной культуры окрашивали гематоксилином и эозином для световой микроскопии и морфометрирования, дальнейшее исследование проводили при помощи трансмиссионного электронного микроскопа.

Морфометрия клеток осуществлялась на программно-аппаратном комплексе анализа изображений, состоящего из персонального компьютера, к которому была создана программа для морфометрических исследований «Морфометр», светового микроскопа с рисовально-проекционным аппаратом РА-7 и компьютерной мыши со световым маркером. Измерения клеток проводили на препаратах кратковременной культуры. В каждой группе были выполнены измерения не менее 50 макрофагов по следующим показателям: периметр, площадь, ориентация, элонгация, компактность, квадратичность, сферичность, округлость, X-проекция, Y-проекция, длина, ширина,

ядерно-цитоплазматическое соотношение.

Гипотезу нормальности распределения значений в выборках проверяли с использованием теста Колмогорова-Смирнова, после чего выборки сравнивались при помощи t-критерия Стьюдента. Количественные данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – ошибка среднего. Учитывались значения, по которым выборки различались на 95% и более.

Результаты исследования и их обсуждение

При действии на культуру клеток лазерным излучением в красном диапазоне, изменения клеток во 2 группе были следующие: появилось значительное число макрофагов, имеющих в цитоплазме крупные, светлые вакуоли сливного характера, в ядре некоторых клеток были признаки пикноза (рис. 1). Это подтверждалось при изучении электроннограмм, где обнаруживались крупные вакуоли с мелкозернистым содержимым (рис. 2).

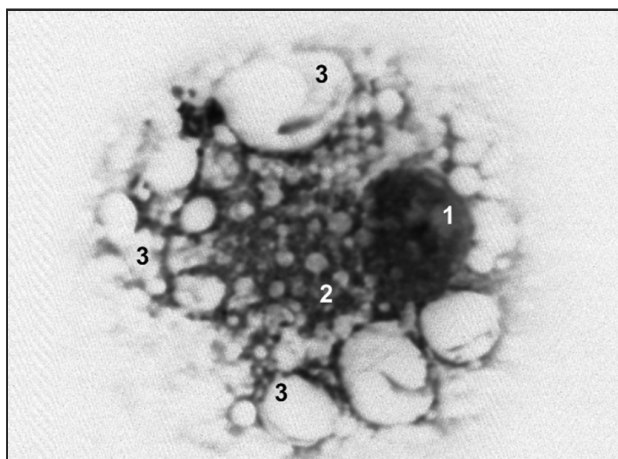


Рис. 1. Крупный макрофаг при действии лазерного излучения в красном диапазоне в дозе 0,2 Дж/см²: 1 – ядро с признаками пикноза; 2 – цитоплазма; 3 – крупные светлые вакуоли. Окраска: гематоксилином и эозином. Увеличение: 1500.

Морфометрический анализ клеток позволил выявить четкие изменения. Происходило статистически значимое увеличение средних показателей площади макрофагов до $123,88 \pm 6,93$ мкм². По данным дисперсионного анализа облучение красным лазером приводило к изменению площади макрофагов с достоверностью 99% (доля влияния 75,76%). Кроме показателя площади наблюдалось статистически значимое увеличение длины, ширины и округлости (табл. 1).

Изучение количественных показателей выявило значительные изменения у различных групп макрофагов. Наибольший рост показателей был отмечен в группе крупных клеток, составляющих 18% от общего числа. Средние макрофаги составили 56%, а 26% клеток были отнесены к группе малых макрофагов. Обращает на себя внимание увеличение длины у всех клеток.

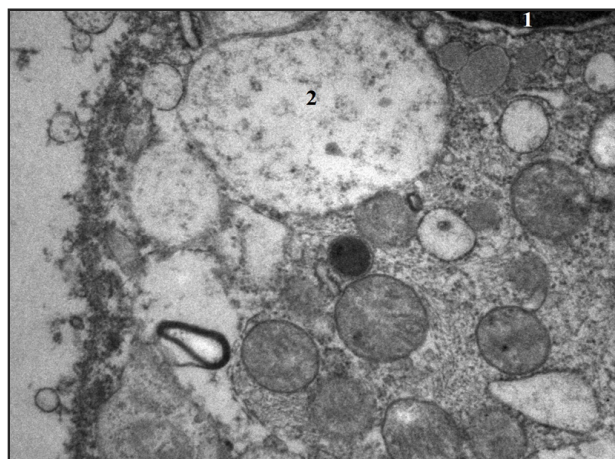


Рис. 2. Фрагмент макрофага при действии лазерного излучения в красном диапазоне в дозе 0,2 Дж/см²: 1 – ядро; 2 – вакуоль. Окраска: уранил ацетатом. Увеличение: 28000.

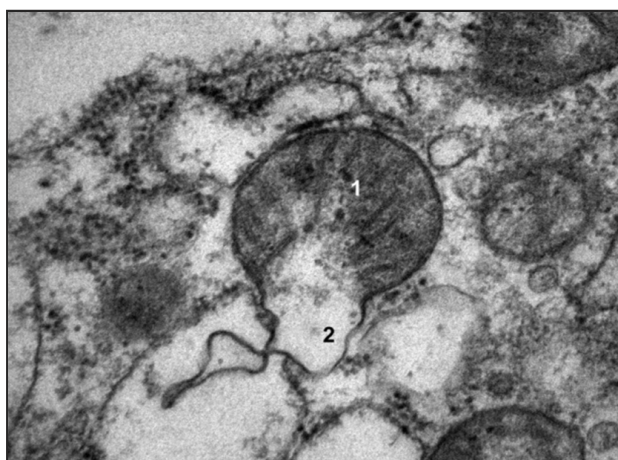


Рис. 3. Фрагмент макрофага при действии лазерного излучения в красном диапазоне в дозе 0,2 Дж/см²: 1 – митохондрия; 2 – зона разрушения. Окраска: уранил ацетатом. Увеличение: 30000.

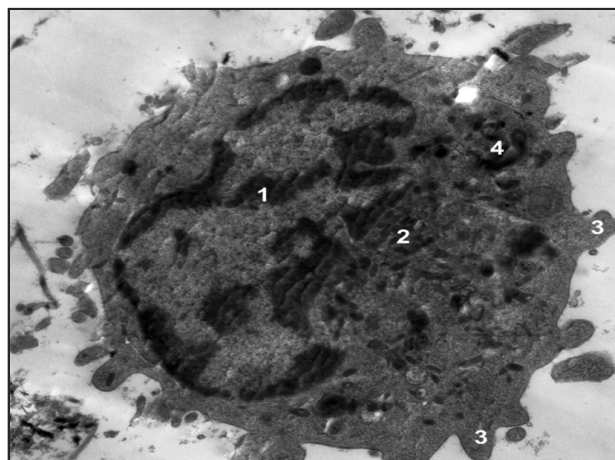


Рис. 4. Фрагмент макрофага при совместном действии лазерного излучения в красном диапазоне в дозе 0,2 Дж/см² и эмоксипина: 1 – ядро; 2 – цитоплазма; 3 – лизосомы, 4 – выросты цитоплазмы. Окраска: уранил ацетатом. Увеличение: 18000.

Таблица 1

Морфометрические показатели макрофагов в исследуемых группах (50 макрофагов в каждой группе, M±m)

Параметры	1 группа	2 группа	3 группа	P _{1,2}
Площадь, мкм ²	50,04±2,07	123,88±6,93***	96,20±4,90***	p ₁ <0,01; p ₂ <0,01
Длина, мкм	8,77±0,26	13,77±0,50**	12,15±0,41	p ₁ <0,01; p ₂ >0,05
Ширина, мкм	5,55±0,25	8,00±0,38**	7,43±0,35	p ₁ <0,01; p ₂ >0,05
Округлость, ед.	3,45±0,09	5,66±0,17**	4,93±0,16*	p ₁ <0,01; p ₂ <0,05

Примечание: p₁ – уровень статистической значимости различий между 1 (контрольной) и 2 группами; p₂ – между 2 и 3 группами.

Преобладали макрофаги со средней длиной, они составляли 90% от всех клеток, 8% приходилось на клетки с максимальной длиной и только 2% составляли клетки с минимальной длиной. Наибольшие изменения в показателях ширины клеток были отмечены в популяции малых макрофагов, их количество составляло 24%. В то же время большинство клеток (56%) были отнесены к группе средних макрофагов. Клетки с максимальной шириной составляли 20%. Округлость была максимальной у 10% клеток, у 2% этот показатель был минимальный и 88% – это клетки средней округлости. Средние значения макрофагов представлены в таблице 2. Макрофаги данной группы характеризовались значительным увеличением всех средних показателей и, особенно, площади. На электроннограммах наблюдалась деструкция митохондрий (рис. 3).

Таблица 2

Популяционный состав макрофагов при действии лазерного излучения в красном диапазоне в дозе 0,2 Дж/см² (M±m)

Параметры	Объекты (n=50)		
	Малые	Средние	Крупные
Площадь, мкм ²	54,8±3,8**	131±4,2**	215±4,1**
Длина, мкм	7,9±0,6**	13,0±0,3**	20,0±0,4**
Ширина, мкм	4,1±0,2**	8,4±0,4**	13,0±0,3**
Округлость, ед.	3,0±0,4**	6,2±0,2*	8,2±0,3

Примечание: * – p<0,05, ** – p<0,01 – уровни статистической значимости различий по сравнению с 1 (контрольной) группой.

При сравнении экспериментальных результатов с контрольными было установлено, что при действии красного лазерного излучения во 2 группе наблюдались изменения большинства макрофагов. Анализ данных показал увеличение всех количественных характеристик макрофагов. Площадь макрофагов резко возрастает в 2,48 раза и имеет самую большую величину среди всех экспериментальных групп. Кроме площади, при облучении макрофагов статистически значимо увеличиваются показатели длины, ширины и округлости клеток. Облучение культуры клеток приводит к увеличению в популяции крупных макрофагов: доля крупных макрофагов увеличивается в 4,5 раза, доля малых клеток увеличивается в 2,09 раза, что в со-

вокупности приводит к уменьшению доли средних макрофагов до 56%. Доза лазерного излучения 0,2 Дж/см² оказала сильное влияние на структуры цитоплазмы: происходит набухание митохондрий, что указывает на энергетическое истощение клеток, это совпадает с мнением ряда авторов, считающих, что действие лазером с длиной волны 0,63 мкм увеличивает мембранный потенциал митохондрий и протонный градиент. Это, в свою очередь, изменяет некоторые реакции NADH-дегидрогеназы и увеличивает скорость обмена АДФ/АТФ, поэтому митохондрии являются критической мишенью, что и подтверждается результатами нашего эксперимента.

Таблица 3

Популяционный состав макрофагов при сочетанном действии лазерного излучения в красном диапазоне в дозе 0,2 Дж/см² и эмоксипина (M±m)

Параметры	Объекты (n=50)		
	Малые	Средние	Крупные
Площадь, мкм ²	47,9±2,2*	102±1,0**	162±3,7**
Длина, мкм	7,3±0,32	12,7±0,03	21±0,62*
Ширина, мкм	4,0±0,17	8,34±0,33	11,9±0,1*
Округлость, ед.	2,8±0,12*	4,6±0,15*	7,0±0,1**

Примечание: * – p<0,05, ** – p<0,01 – уровни статистической значимости различий по сравнению со 2 группой (облучение красным лазером).

При анализе полученных данных была выявлена высокая степень воздействия лазера на макрофаги. По видимому, доза 0,2 Дж/см² была предельной, вызывающей деструктивные изменения в клетках. При сочетанном действии эмоксипина и лазерного излучения в красном диапазоне отмечено статистически значимое снижение таких количественных показателей макрофагов, как площадь и округлость клетки (табл. 3). Популяционный состав макрофагов при действии красного лазера в комбинации с эмоксипином практически не менялся. На электроннограммах макрофагов выявлялись выросты и инвагинации плазмолеммы (рис. 4), не отмечались деструктивно измененные митохондрии, было снижено количество дегенеративных клеток.

Выводы

1. Установлены морфометрические критерии, позволившие объективно оценить реакцию макрофагов легких в кратковременной культуре и на основе количественного анализа выделить группы малых, средних и крупных клеток.

2. Действие лазерного излучения в красном диапазоне в дозе 0,2 Дж/см² приводит к изменениям морфологии, количественных характеристик и популяционного состава макрофагов легких. Число крупных клеток при облучении красным лазером возрастало в 4,5 раза, изменялось большинство количественных показателей, выявлялись деструктивные изменения митохондрий.

3. Добавление в инкубационную среду эмоксипина при облучении макрофагов красным лазером привело к уменьшению дегенеративных изменений в цитоплазме клеток, снижая таким образом побочные эффекты лазерного излучения в красном диапазоне в дозе 0,2 Дж/см².

ЛИТЕРАТУРА

1. Волков В.В. Варианты отношений «доза–эффект» применительно к лазерному воздействию на биоткани // Материалы I междунар. конгресса «Лазер и здоровье». М.: Техника, 1997. С.12.

2. Гамалея Н.Ф. Механизмы биологического действия излучения лазеров // Лазеры в клинической медицине: руководство для врачей / под ред. С.Д.Плетнева. М.: Медицина. 1996. С.51–97.

3. Голохваст К.С. Чайка В.В. Альвеолярный макрофаг (краткий обзор) // Вестник новых мед. технол. 2011. Т.ХVIII, №2. С.23–26.

4. Лепеха Л.Н. Макрофаги легких // Клеточная биология лёгких в норме и при патологии / под ред. В.В.Ерохина, Л.К.Романовой. М.: Медицина, 2000. С.234–252.

5. Мукоцилиарная активность реснитчатого эпителия бронхов у больных БА до и после лазеротерапии / М.Т.Луценко [и др.] // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 1999. Вып.4. С.49–53.

6. Огородникова Т.Л. Структурная гетерогенность альвеолярных макрофагов в норме и при лазерном воздействии in vitro // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2004. Вып.19. С.34–36.

7. Огородникова Т.Л. Популяционный состав альвеолярных макрофагов при экспериментальном воздействии in vitro / Материалы 6-й междунар. науч.-практ. конф. «Достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины» // Астраханский мед. журн. 2008. Т.3, №3. С.118–120.

8. Огородникова Т.Л. Альвеолярные макрофаги: изменение популяционного состава при экспериментальном воздействии // Вестник новых мед. технол. 2010. Т.ХVII, №2. С.74–75.

9. Пауков В.С., Даабиль С.А., Беляева Н.Ю. Роль макрофагов в патогенезе ограниченного воспаления // Архив патологии. 2005. Т.67, №4. С.3–10.

10. Плехова Н.Г., Дробот Е.И., Сомова Л.М. Реактивность фагоцитирующих клеток при инициации вос-

палительных процессов // Успехи современной биологии. 2011. №1. С.37–49.

11. Романова Л.К., Макарова Л.Ф. Клеточный состав бронхоальвеолярной лаважной жидкости и митотическая активность клеток моноцитарно-макрофагального ряда крыс при длительной прерывистой гипоксии // Бюл. эксп. биол. и мед. 2000. №10. С.388–390.

12. Рудик Д.В., Тихомирова Е.И. Исследование функциональной активности макрофагов перитонеального экссудата мышей при воздействии низкоинтенсивного лазерного излучения системами in vitro и in vivo // Биофизика. 2007. Т.52, №5. С.931–937.

13. Старикова Э.А., Киселева Е.П., Фрейндлин И.С. Гетерогенность мононуклеарных фагоцитов: субпопуляции или проявление пластичности // Успехи современной биологии. 2005. Т.125, №5. С.466–477.

14. Karu T., Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1995. Vol.27. P.219–223.

15. Macrophage activation and polarization / F.O.Martinez [et al.] // Front. Biosci. 2008. №13. P.453–461.

REFERENCES

1. Volkov V.V. *Materialy I Mezhdunarodnogo kongressa «Lazer i zdorov'e»* (The Materials of I International Congress «Laser and health»). Moscow: Tekhnika; 1997:12.

2. Gamaley N.F. *Mekhanizmy biologicheskogo deystviya izlucheniya lazerov. V knige: Pletnev S.D. (red.). Lazery v klinicheskoy meditsine* [Mechanisms of biological influence of laser radiation. In: Pletnev S.D., editor. Lasers in clinical medicine]. Moscow: Meditsina; 1996.

3. Golokhvast K.S., Chayka V.V. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy 2011; XVIII(2):23–26.*

4. Lepekha L.N. *Makrofagi legkikh. V knige: Erokhina V.V., Romanova L.K. (red.). Kletochnaya biologiya legkikh v norme i pri patologii* [Lungs macrophages. In: Erokhina V.V., Romanova L.K., editors. Cell biology of lungs in the norm and pathology]. Moscow: Meditsina; 2000: 234–252.

5. Lutsenko M.T., Prikhod'ko V.B., Odireev A.N., Galigberov A.A. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniya* 1999; 4:49–53.

6. Ogorodnikova T.L. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniya* 2004; 19:34–36.

7. Ogorodnikova T.L. *Astrakhanskiy meditsinskiy zhurnal* 2008; 3:118–120.

8. Ogorodnikova T.L. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy* 2010; 2:74–75.

9. Paukov V.S., Daabul' S.A., Belyaeva N.Yu. *Arkhiv patologii* 2005; 67(4):3–10.

10. Plekhova N.G., Drobot E.I., Somova L.M. *Uspekhi sovremennoy biologii* 2011; 1:37–49.

11. Romanova L.K., Makarova L.F. *Byulleten Eksperimentalnoi Biologii i Meditsiny* 2000; 1:388–390.

12. Rudik D.V., Tikhomirova E.I. *Biofizika* 2007; 5:931–937.

13. Starikova E.A., Kiseleva E.P., Freyndlin I.S. *Uspekhi sovremennoy biologii* 2005; 125(5):466–477.

14. Karu T., Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1995; 27:219–223.

15. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* 2008; 13:453–461.

Поступила 28.10.2013

Контактная информация

*Татьяна Леонидовна Огородникова,
кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры гистологии,
Амурская государственная медицинская академия,
675000, г. Благовещенск, ул. Горького, 95.
E-mail: OgorodnikovaTL@mail.ru*

Correspondence should be addressed to

*Tat'yana L. Ogorodnikova,
PhD, Senior lecturer of Department of Histology,
Amur State Medical Academy,
95 Gor'kogo Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation.
E-mail: OgorodnikovaTL@mail.ru*