

УДК: 57.043 : 57.084.1–615.832.96 : 616.71

Д.М. Пошелок, С.В. Малишкіна, Л.М. Бенгус МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ В ОСТЕОЦИТАХ КОМПАКТНОЇ КІСТКИ ЩУРІВ В УМОВАХ МОДЕЛЮВАННЯ ГІПОТЕРМІЇ

ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України»

Пошелок Д.М., Малишкіна С.В., Бенгус Л.М. Морфологічні зміни в остеоцитах компактної кістки щурів після дії змодельованої гіпотермії // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 4. – С. 68-73.

В експерименті на 14 щурах досліджували структурну організацію остеоцитів компактної кістки діяфіза в умовах дії змодельованої гіпотермії. Встановлено, що у кістковій тканині діяфіза спостерігається значна кількість остеоцитів з пікнотичними ядрами та пустих лакун остеоцитів. Відмічається розширення лакун остеоцитів, що призводить до збільшення їх площі. Порушується ультраструктурна організація клітин – гетерохроматизація ядра, розширення перинуклеарних просторів, деструкція органел цитоплазми.

Ключові слова: експеримент, щури, гіпотермія, остеоцити.

Пошелок Д.М., Малишкіна С.В., Бенгус Л.М. Морфологические изменения в остеоцитах компактной кости крыс после действия смоделированной гипотермии // Украинский морфологический альманах. – 2013. – Том 11, № 4. – С. 68-73.

В эксперименте на 14 крысах исследовали структурную организацию остеоцитов компактной кости диафиза в условиях действия смоделированной гипотермии. Показано, что в костной ткани диафиза наблюдается значительное количество остеоцитов с пикнотичными ядрами и пустых лакун остеоцитов. Отмечается расширение лакун остеоцитов, что приводит к увеличению их площади. Нарушается ультраструктурная организация клеток – гетерохроматизация ядра, расширение перинуклеарных пространств, деструкция органелл цитоплазмы.

Ключевые слова: эксперимент, крысы, гипотермия, остеоциты.

Poshelok D.M., Malyshkina S. V., Bengus L.M. Morphological changes in the osteocytes of compact bone in rats under of modeled hypothermia // Украинский морфологический альманах. – 2013. – Том 11, № 4. – С. 68-73.

In the experiment on 14 rats studied the structural organization of osteocytes compact bone diaphysis under the action modeled hypothermia. It was shown, that bone diaphysis there is a significant number of osteocytes with piknotic of nuclei and empty lacunae of osteocytes. Marked expansion of the lacunae of osteocytes, which leads to an increase in their area. Disturbed ultrastructural organization of cells – heterochromatization of nuclei, extension perinuclear spaces, destruction cytoplasm organelles.

Key words: experiment, rats, hypothermia, osteocytes.

Вступ. В період окремих видів виробничої діяльності та через різні причини людина часто зазнає вплив низьких температур. Холод помірної інтенсивності позитивно впливає на організм людини. Однак недосконалість методів його дозування в умовах стаціонару, надмірна дія в природних умовах можуть привести до глибоких морфологічних змін не тільки в окремих органах, але й організмі в цілому. У літературі широко представлені дослідження щодо впливу гіпотермії на особливості вентиляції легень, функцію головного мозку, периферичні нерви, імунну систему, серцеву діяльність, кровообіг та шкіру [3, 5, 14, 16, 17, 26]. Проте, незважаючи на поширеність досліджень дії холодового фактору на людину, особливості впливу загальної гіпотермії на кісткову тканину вивчені недостатньо. Відомі лише окремі експериментальні роботи стосовно дії гіпотермії на кісткову тканину, де розкривається її негативний вплив на культивовані клітини кісткового мозку та остеобласти [19, 23, 24].

Гіпотермія (грец. – *hypo* «низь», *therme* «тепло») або переохолодження – це стан організму, при якому температура тіла падає нижче, ніж потрібно для підтримки нормального обміну речовин і функціонування, тобто гіпотермія – це стан, який зумовлений зниженням внутрішньої температури тіла людини до 35 °С і нижче. В літературі існує чимало класифікацій гіпотермії. Н.Е. Мишук (2006) та Max John (2006) класифікують гіпотермію, залежно від рівня зниження температури тіла, як легку (32-35°C), помірну (28-32°C), тяжку (28-20°C) і глибоку (< 20°C) [10, 21].

Мета дослідження - дослідити морфологі-

чні зміни в остеоцитах компактної кістки щурів після дії загальної легкої гіпотермії.

Матеріал та методи. Експериментальні дослідження виконані на 14 нелінійних білих щурах (самці 6-місячного віку) популяції експериментально-біологічної клініки ДУ «ІПХС ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України» у 2 серіях:

1 серія (дослід, 9 щурів) – тварини, яким моделювали загальну легку гіпотермію шляхом 5-добового перебування щурів у холодильній камері (t=-20°C) впродовж 5 годин щоденно. Щури знаходились у відсіках камери поодиноці. Ректальну температуру вимірювали кожної доби після закінчення холодової дії. Середні значення ректальної температури після п'ятигодинного перебування у холодильній камері впродовж п'яти діб знизились на 1,5-2 °С.

2 серія - контроль (5 щурів). Тварин утримували поодиноці у клітках при кімнатній температурі. Контрольні та дослідні тварини утримувались на стандартному раціоні.

Виведення тварин з експерименту виконували на 14 добу після останнього сеансу гіпотермії шляхом внутрішньом'язового передозування тіопенталу натрію. Експерименти на щурах проведені з дотриманням вимог Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження» та «Європейської конвенції захисту хребетних тварин ...» [6, 11]. Протокол експериментальних досліджень затверджений Комітетом з біоетики ДУ «ІПХС ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України» (протокол № 88 від 30.05.2011 р.).

Матеріалом для дослідження служили фрагменти діяфіза (середня частина) стегнових кісток щурів. У роботі використані гістологічні та електронно-мікроскопічні методи.

Для гістологічного дослідження обробку фрагментів діяфіза стегнової кістки проводили за стандартними методами, керуючись рекомендаціями Д.С. Саркісова та Ю.Л. Перова (1996) [9]. Поперечні зрізи діяфіза (6-10 мкм) виготовляли на санному мікротомі "Reichert", забарвлювали гематоксилином Вейерта та еозином. Дослідження гістологічних зрізів проводили у світловому мікроскопі MICROS (об. $\times 10$, $\times 40$, ок. $\times 10$). Виконано підрахунок кількості остеоцитів та порожніх лакун остеоцитів у полі зору мікроскопа (об. $\times 40$, ок. $\times 10$), а також було визначено середню площу лакун остеоцитів, за результатом вимірювання довжини малої та великої вісі лакун за допомогою окуляр-мікрометра МОВ-15^х.

У кожному окремому випадку аналізували три зрізи та три поля зору на кожному зрізі. Отримані цифрові дані були оброблені методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Ст'юдента. Статистично значимою вважали різницю у разі $p < 0,05$.

Для ультраструктурного дослідження вилучений фрагмент діяфіза стегнової кістки розрізали на шматочки розміром $\approx 1 \text{ мм}^3$ та обробляли за стандартним методом електронної мікроскопії відповідно до рекомендацій Б. Уикли (1975): фіксація у 4 % розчині глютаральдегіду на фосфатному буфері, декальцинація у 0,1 М розчині трилону Б, що містить 4 % глютаральдегіду, додаткова фіксація у 1 % розчині чотирьохокису осмію (OsO_4), деїдратація у розчинах етилового спирту зростаючої міцності та в апетоні, заключення в суміш епоксидних смол з епону та аралдиту [13]. Напівтонкі (1-2 мкм) та ультратонкі зрізи (60-90 нм) виготовляли за допомогою скляних ножів на ультрамікротомі УМПТ-3М. Ультратонкі зрізи контрастували цитратом свинцю та уранілапетатом за

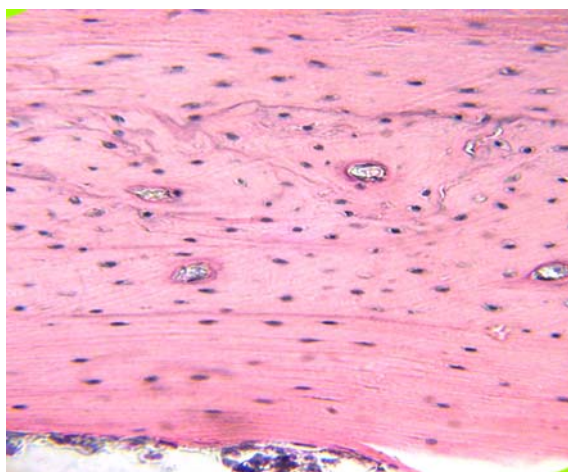
Reynolds [25]. Ультраструктурний аналіз проводили у трансмісійному електронному мікроскопі ЕМВ-100БР ($\times 3\ 000$ – $35\ 000$).

Результати досліджень та їх обговорення.

Мікроскопічний аналіз показав, що на поперечних зрізах діяфізів *контрольних* щурів виявляється шар внутрішніх та зовнішніх генеральних кісткових пластинок зі слабо базифільними цементними лініями, а також остеонний шар з різною структурою остеонів і центральними каналами з кровоносними судинами (рис. 1а). Забарвлення матриксу кістки еозином рівномірне, слабо оксифільне. По всій території зрізів діяфіза спостерігається велика кількість яскраво забарвлених остеоцитів з ядрами округлої та овальної форми. Більшу частину клітини займає крупне базифільне ядро. Клітини розташовуються у продовгуватих лакунах (див. рис. 1а). Місцями зустрічались поодинокі порожні лакунки без остеоцитів та остеодити з пікнотичними ядрами. При електронно-мікроскопічному дослідженні встановлено, що значна частина ядра представлена еухроматином. Гетерохроматин локалізований на внутрішній поверхні ядерної мембрани та розподілений у вигляді невеликих брилець по всій території ядра (рис. 1б). Ядерця в ядрах остеоцитів відсутні. Навколо ядра розташовується вузька облямівка цитоплазми, де виявляються короткі поодинокі каналні елементи гранулярної ЕПС (нечисленні вільні рибосоми), а також невелика кількість мітохондрій та лізосом.

За результатами морфометричного дослідження встановлено, що кількість остеоцитів (у полі зору мікроскопа) становить $70,7 \pm 6,6$ клітин, а кількість порожніх лакун дорівнює $3,6 \pm 0,3$, що складає 5,1 %. Площа лакун остеоцитів становить $50,87 \pm 3,5 \text{ мкм}^2$.

По території зрізів діяфіза у проривних каналцях спостерігаються різнокаліберні кровоносні судини з вузькими просвітами, стінки яких слабо базифільні. В просвітах судин розташовуються клітинні елементи крові (рис. 2).



А



Б

Рис. 1. Фотовідбиток гістопрепарату в ділянці діяфіза контрольних щурів: а) шари зовнішніх та внутрішніх генеральних пластинок і остеонний шар з остеонами. Висока щільність остеоцитів. Гематоксилін та еозин. Ок. $\times 10$, об. $\times 40$; б) фотовідбиток електроннограми. Остеоцит продовгуватої форми в лакуні. Крупне овальне ядро з переважанням еухроматину. Вузька облямівка цитоплазми з незначною щільністю мембранних органел. Контрастовано за Рейнольдсом. Зб. 6000.

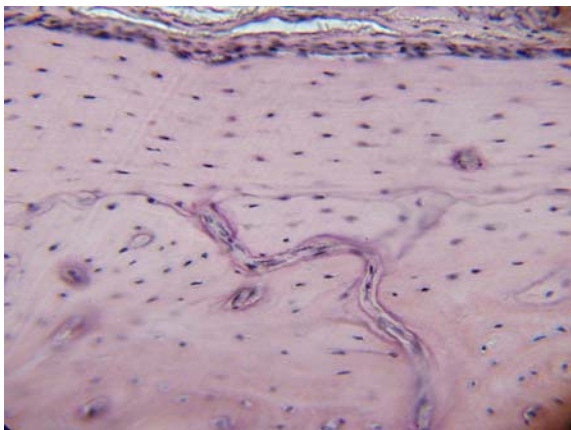


Рис. 2. Фотовідбиток гістопрепарату у ділянці діафіза контрольних щурів. Тонкостінна кровоносна судина у проривному каналі остеонного шару з клітинами крові у вузькому просвіті. Контроль. Гематоксилін та еозин. Ок.х10, об. х 40.

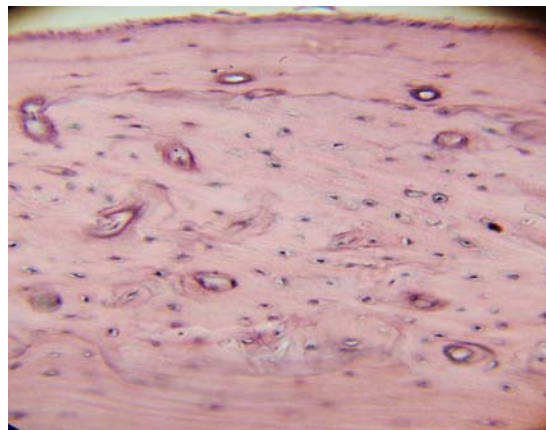


Рис. 3. Вузький шар зовнішніх генеральних кісткових пластинок, слабо виражена структура остеонного шару та внутрішні генеральні кісткові пластинки. Нерівномірна щільність остеоцитів. Порожні центральні кісткові канали у шарі зовнішніх генеральних пластинок. Дослід. Гематоксилін та еозин. Ок.х10, об. х40.

На зрізах діафіза дослідних щурів на 14 добу після холодової дії також виявляються пари зовнішніх та внутрішніх кісткових генеральних пластинок, між якими розташовується широкий остеонний шар зі слабо вираженою структурою остевів (рис. 3).

Звертає увагу те, що по території зрізів діафіза дослідних щурів виявляється виражена нерівномірність у розташуванні остеоцитів (див. рис. 3). Їх щільність менша у зовнішніх та внут-

рішніх генеральних кісткових пластинках, у порівнянні з остеонним шаром. Виявляється значна кількість порожніх лакун. За даними морфометричного дослідження встановлено, що кількість остеоцитів була на 33,8 % меншою від показників у контрольних щурів (рис. 4 а). Відсоток порожніх лакун у діафізах дослідних щурів склав 13,6 % і порівняно з контролем їх кількість збільшилась більш ніж у 2 рази (рис. 4 б).

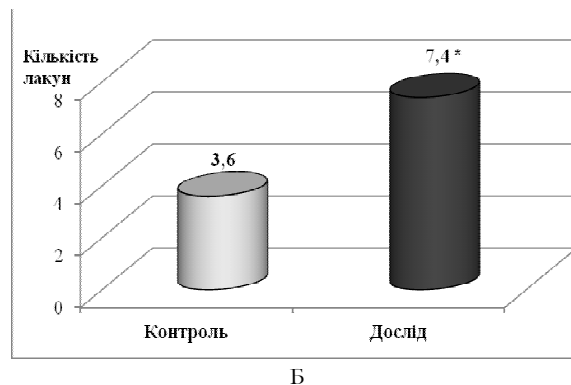
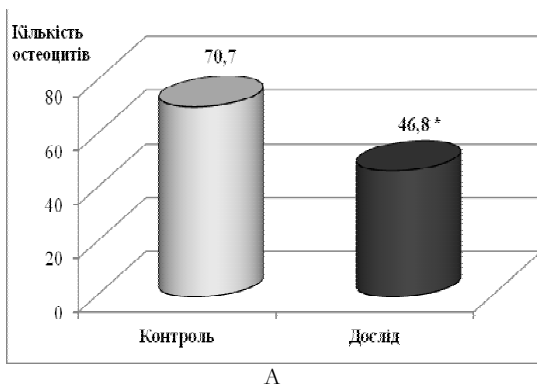
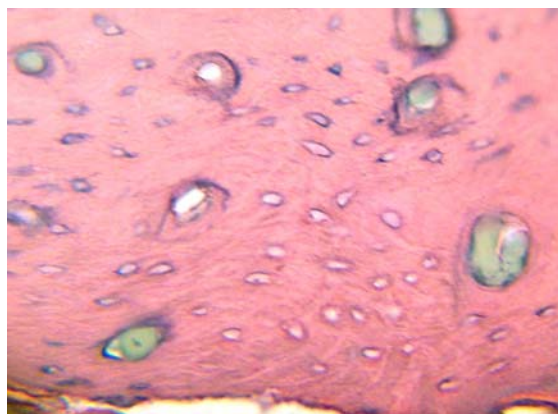


Рис. 4. а) кількість остеоцитів у полі зору мікроскопа; б) кількість порожніх лакун остеоцитів. * – $p < 0,05$ порівняно з контролем.

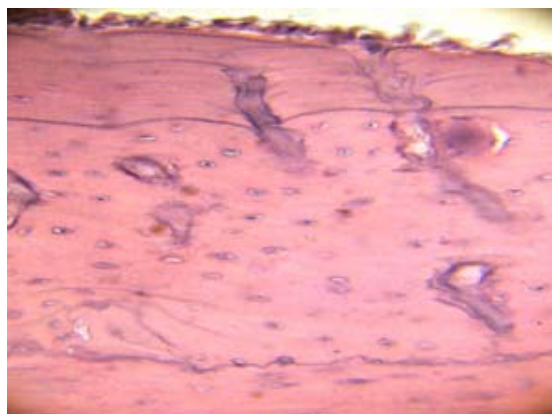
На відміну від контрольних щурів на зрізах діафіза дослідних щурів спостерігається значна кількість розширених центральних каналів остеонів. Їх стінки узуровані та виражено базофільні. Частина з них порожня або заповнена тканинним детритом (рис. 5 а).

Більша частина пронизних кровоносних судин у проривних каналах на зрізах діафіза порожня або заповнена гомогенними рожевими масами чи детритом (рис. 5 б). Стінки судин виражено базофільні. Поблизу таких судин спостерігаються остеоцити різної структурної організації – відзначаються остеоцити, які містять пікнотичні ядра, порожні лакунки остеоцитів та ділянки кісткового матриксу, де остеоцити не виявляються (рис. 5 а, б).

Встановлені зміни у кровоносному руслі діафіза дослідних щурів свідчать про негативний вплив гіпотермії на кровопостачання кістки, а це, в свою чергу, негативно відбивається на структурній організації, в першу чергу, клітин кісткової тканини. Із літератури відомо, що стан кісткової тканини значною мірою залежить від структурно-функціональних характеристик мікроциркуляторного русла [4, 20]. Зв'язок між структурними порушеннями у кровоносних судинах кісток щурів з дегенеративними змінами кісткової тканини спостерігали і в умовах дії інших несприятливих факторів, а саме у щурів, які знаходились у антиопорно-статичному положенні (модель розвантаження) впродовж 28 діб [2, 8].



А



Б

Рис. 5. Фотовідбитки гістопрепаратів у ділянці діяфіза дослідних щурів: а) численні центральні канали остевів з вираженою базофілією стінок. Детрит у просвіті частини кісткових каналів. Порожні лакуни остевитів; б) базофілія та нерівномірність стінок судинних каналів, пусті просвіти судин. Гематоксилін Вейгерта та еозин. Ок.х10, об. х40.

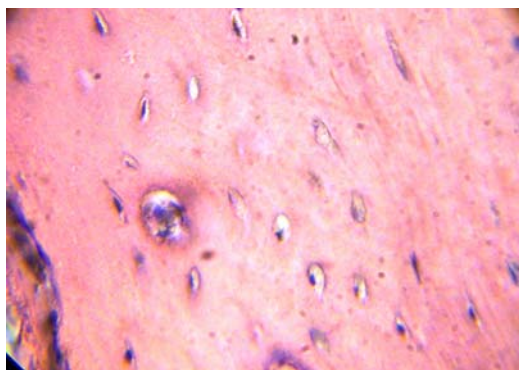


Рис. 6. Фотовідбиток гістопрепарату в ділянці діяфіза дослідних щурів. Вузькі видовжені лакуни остевитів з продовгуватими ядрами клітин, а також широкі лакуни остевитів з дрібними пікнотичними ядрами клітин. Гематоксилін Вейгерта та еозин. Ок.х10, об. х 40.

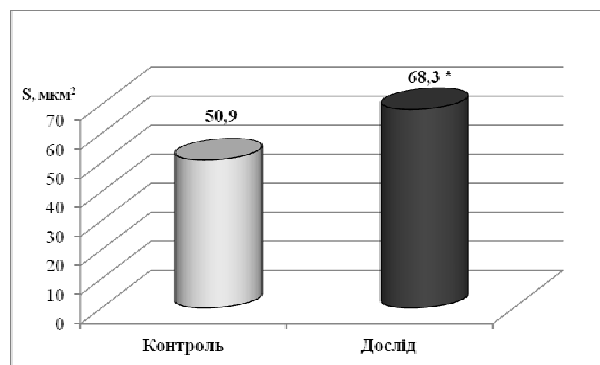
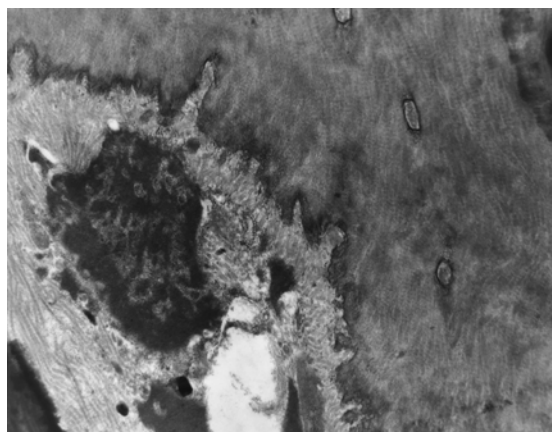


Рис. 7. Площа лакун остевитів. * – $p < 0,05$ порівняно з контролем.



А



Б

Рис. 8. а) лакуна з остевитом, ядро якого виражено гетерохроматизоване – некроз остевита. Зб. 22800; б) некроз остевита у розширеній лакуні з зазубреними краями. Контрастовано за Рейнольдсом. Зб. 10000.

Звертає увагу виражена неоднорідність у будові, формі та розмірах остевитів. По території зрізів діяфіза виявляються продовгуваті остевити з такими ж ядрами у вузьких лакунах, а також овальні розширені лакуни з остевитами, які

містять переважно дрібні пікнотичні ядра (рис. 6). Присутні ділянки кістки з лакунами, які містять детрит.

Спостерігаються численні, переважно розширені, порожні лакуни (див. рис. 4-6). Площа

лакун остеоцитів у щурів дослідної групи була в середньому на 25,5 % більшою за площу лакун у контрольних щурів (рис. 7). Контури окремих лакун втрачають чіткість і стають «розмитими».

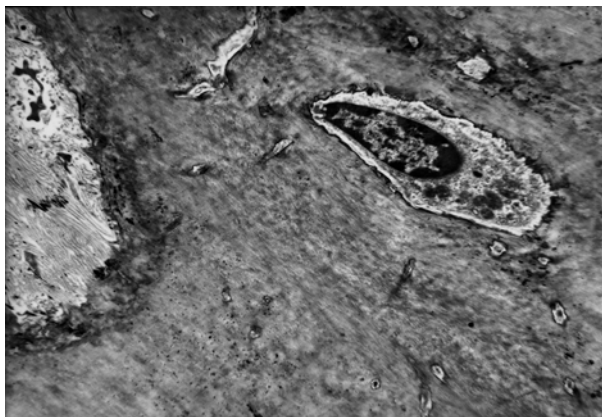
За допомогою електронно-мікроскопічного дослідження було встановлено, що ультраструктурна організація значної частини остеоцитів була порушена. Виявлялись остеоцити з вираженою гетерохроматизацією ядра та деструкцією цитоплазматичних органел (рис. 8 а). У цитоплазмі окремих остеоцитів відмічені осередки гомогенізації.

Місцями виявляються остеоцити з гетерохроматизованими ядрами та деструкцією цитоплазми. Відмічається некроз остеоцитів (рис. 8 б). Такі остеоцити розташовуються у розширених лакунах, стінки яких виражено узуровані з зубуринами. Такі лакуни ми відносимо до резорційних. Це може бути відображенням актива-

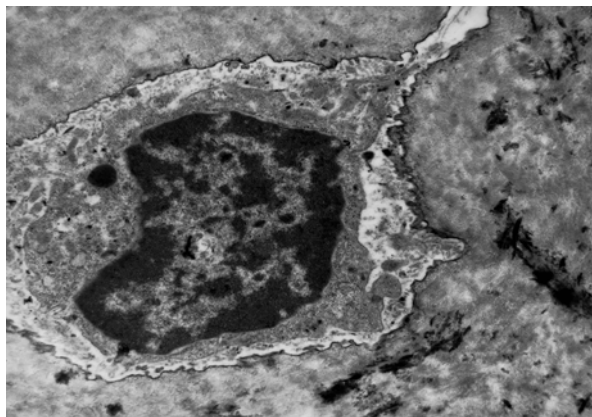
ції періостеоцитарного остеолізу.

Подекуди зустрічались остеоцити різної форми зі збереженою ультраструктурною організацією (рис. 9).

Останнім часом встановлено, що остеоцити є багатофункціональними клітинними елементами кістки і їх життєздатність та функціональна активність мають велике значення для збереження структурно-функціональної цілісності скелета [1]. Доведено, що остеоцити беруть участь у процесах ремоделювання кісткової тканини шляхом остеолізу та внутрішньо лакунарного формування кісткового матриксу в залежності від механічних і метаболічних впливів [1, 12, 15, 18], тому можна стверджувати, що поява остеоцитів з пікнотичними ядрами, пустих лакун остеоцитів і розширення остеоцитарних лакун у діафізі щурів дослідної групи пов'язано з активацією остеоцитарного остеолізу.



А



Б

Рис. 9. а) остеоцит з ядром у якому відмічається як еухроматин, так і гетерохроматин. У цитоплазмі присутні лізосоми. Поряд порожня лакуна остеоцита. Зб. 4000; б) зубурені краї лакуни остеоцита. У ядрі визначаються пори. Низька щільність мембранних органел у цитоплазмі клітини. Контрастовано за Рейнольдсом. Зб. 8000.

Остеоцити активно реагують на дію різноманітних несприятливих факторів. У літературі є дані, що в умовах гіпокінезії спостерігається збільшення кількості пустих лакун та розширення площі остеоцитарних лакун [7, 22].

Таким чином, в експерименті на щурах досліджено структурну організацію остеоцитів компактної кістки діафіза після дії змодельованої гіпотермії. Встановлено, що у кістковій тканині діафіза спостерігається значна кількість остеоцитів з пікнотичними ядрами та пустих лакун остеоцитів. Відмічається розширення лакун остеоцитів. Порушується ультраструктурна організація остеоцитів: гетерохроматизація клітинного ядра, деструкція органел цитоплазми, підвищення вмісту лізосом та розширення лакун остеоцитів, що свідчить про активацію остеоцитарного остеолізу. Звертає увагу деструкція кісткових каналів та кровеносних судин, а також їх запустіння, відмічається деструкція ендотеліальної стінки кровеносних судин, що вказує на порушення мікроциркуляції компактної кістки під впливом загальної гіпотермії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Аврунин А.С. Остеоцитарное ремоделирование: история вопроса, современные представления и возможности клинической оценки / А.С. Аврунин // Травматология и ортопедия России. – 2012. – Т. 63, № 1. – С. 128-134.
2. Бабак С. В. Изменения в структуре каналов и кровеносных сосудов бедренных костей крыс при снятии опорной нагрузки / С.В. Бабак // Український морфологічний альманах. – 2010. – Т. 8, № 2. – С. 5-7.
3. Бабийчук В.Г. Количественная оценка антиген-специфических клеток в крови человека после ритмических холодových воздействий // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, № 2. – С. 143-153.
4. Бруско А.Т. Функциональная перестройка костей и ее клиническое значение / А.Т. Бруско, Г.В. Гайко. – Луганск, 2005. – 211 с.
5. Даценко Г.В. Морфофункциональные изменения в организме в ответ на общую и локальную гипотермию (обзор литературы) /

- Г.В. Даценко, Е.Н. Шаповал // Вісник морфології. – 2001. – № 2. – С. 305-307.
6. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Страсбург, 18 березня 1986 року: офіційний переклад [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137.
7. Золотова-Гайдамака Н.В. Морфологические изменения в остеоцитах в условиях моделированной гипокинезии / Н.В. Золотова-Гайдамака, Н.В. Родионова // Український морфологічний альманах. – 2010. – Т.8, № 2. – С. 66-68.
8. Золотова-Гайдамака Н.В. Морфологические особенности остеоцитов бедренной кости белых крыс при воздействии гипокинезии / Н.В.Золотова-Гайдамака, М.А. Исламова // Вісник проблем біології і медицини. – 2011. – Т. 1, № 3. – С. 70-74.
9. Микроскопическая техника: Руководство / Под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова. – М.: Медицина, 1996. – 544 с.
10. Мищук Н.Е. Холодовая болезнь (гипотермия) / Н.Е. Мищук // Медицина неотложных состояний. – 2006. – Т. 4, № 5. – С. 42-47.
11. Про захист тварин від жорстокого поводження : Закон України № 3447-IV від 21.02.2006 р. [Електронний ресурс] / Верховна Рада України. – Офіц. веб-сайт. – Режим доступу до документа <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=3447-15>.
12. Родионова Н.В. Цитологічні механізми перебудов у кістках при гіпокінезії та мікрогравітації / Н.В. Родионова // НВП Видавництво «Наукова думка» НАН України». – 2006. – 238с.
13. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих / Б. Уикли. – М.: Мир, 1975. – 324 с.
14. Baylor K. Peripheral nerve at extreme low temperatures 2: pharmacologic modulation of temperature effects / K. Baylor, M.M. Stecker // Cryobiology. – 2009. – Vol. 59, № 1. – P. 12-18.
15. Bonewald L.F. The Amszing osteocyte / L.F. Bonewald // J. Bone Mineral Res. – 2011. – Vol. 26, № 2. – P. 229-238.
16. Cardiovascular effects of epinephrine during rewarming from hypothermia in an intact animal model / T.V. Kondratiev, E.S. Myhre, O. Simonsen [et al.] // J. Appl. Physiol. – 2006. – Vol. 100, № 2. – P. 457-464.
17. Effects of pH management during deep hypothermic bypass on cerebral microcirculation: alpha-stat versus pH-stat / L.F. Duebener, I. Hagino, T. Sakamoto [et al.] // Circulation. – 2002. – Vol. 106, № 12, suppl. 1. – P. 103-108.
18. Franz-Odenaal T.A. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes/ T.A. Franz-Odenaal, B.K. Hall, P.E. Witten // Dev. Dyn. – 2006. – Vol. 235, № 1. – P. 176-190.
19. Hypothermia stimulates osteoklastogenesis but inhibits osteoblast differentiation and bone formation / J. Patel, I. Orriss, M. Key [et al.] // Done. – 2009. – Vol. 44, № 2. – S. 305.
20. Martiniakova M. Histological analysis of compact bone tissue in adult laboratory rats / M. Martiniakova, R. Omelka, B. Grosskopf // Slovak J. Anim. Sci. – 2009. – Vol. 42. – P. 56-59.
21. Rosen's emergency medicine: concepts and clinical practice / Eds. J.A. Marx, R.S. Hockberger, R.M. Walls, J. Adams, P. Rosen. – Mosby: Elsevier, 2006. – P. 2239.
22. Mechanical loading: biphasic osteocyte survival and targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone / B.S. Noble, N. Peet, H.Y. Stevens [et al.] // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2003. – Vol. 284, № 4. – P. 934-943.
23. Meghji S. Osteoblasts respond to mild-heat stress by change in OPG/RANKI ratio / S. Meghji, A. Maddi, G. Vinayahah // Am. Soc. Bone Mineral Res. – 2006. – № 3. – P. 1155-1158.
24. Motyl K.J. Temperatures rising: brown fat and bone / K.J. Motyl, C.J. Rosen // Discov. Med. – 2011. – Vol. 11, № 58. – P. 179-185.
25. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy / E.S. Reynolds // J. Cell. Biol. – 1963. – Vol. 17. – P. 208-212.
26. The effect of cerebral hypothermia on white and grey matter injury induced by severe hypoxia in preterm fetal sheep / L. Bennet, V. Roelfsema, S. George [et al.] // J. Physiol. – 2007. – Vol. 578, Pt. 2. – P. 491-506.

Надійшла 18.09.2013 р.

Рецензент: проф. В.І. Лузін