УДК 636.2:612.64.089.67

А.И. БУДЕВИЧ, С.Н. ПАЙТЕРОВ, С.А. САПСАЛЕВ,
Ю.К. КИРИКОВИЧ, Т.Н. ЛУКАШЕВИЧ, И.В. МИХЕДОВА,
И.И. БУДЕВИЧ, П.Е. САХОНЧИК

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КРИОФИЛАКТИКОВ И ПРИЕМОВ ПОДГОТОВКИ ЭМБРИОМАТЕРИАЛА КОРОВ-ДОНОРОВ К ПРЯМОЙ ПЕРЕСАДКЕ

РУП «Научно-практический центр национальной академии наук Беларуси по животноводству»

Введение. В настоящее время в республике все большее значение приобретают интенсивные пути развития молочного скотоводства с использованием современных достижений генетики, селекции, биотехнологии и других биологических наук, что стало возможным благодаря применению последних разработок прогрессивных методов ускоренного размножения высокоценных племенных животных, к которым относится технология трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота. Эффективность практического использования пересадок зародышей в скотоводстве во многом зависит и от возможности длительного сохранения биоматериала вне организма матери в глубокозамороженном состоянии, так как позволяет спланировать время проведения пересадок независимо от сроков получения. Однако основными технологическими недостатками криоконсервирования являются 15-20%-ная браковка эмбриоматериала после оттаивания и снижение уровня приживляемости эмбрионов у реципиентов.

Вместе с тем, разработанный в 1984 году Leibo SP [1] метод прямой пересадки (Direct transfer) эмбрионов крупного скота позволяет, используя комплекс защитных сред, произвести пересадку оттаянных клеток без последующей регидратации. При этом от момента разморозки зародыша до его имплантации в матку проходит от 30 до 40 минут. В то же время, при использовании метода прямой пересадки эмбрион достигает места нидации в роге матки реципиента спустя 3-5 минут после его оттаивания [2, 3]. Однако унификация методов эмбриотрансплантации, в том числе и прямой пересадки, в Европе и Америке не позволяет учитывать в технологии криоконсервирования зародышей их стадию развития, целесообразность использования различных криопротекторов в зависимости от вида клеток (морулы или бластоцисты), их качество, различную скорость снижения температуры, а также возможность использования различных питательных и

поддерживающих сред при одношаговой (one-step-straw) методике их регидратации или без нее. Разработка новых элементов способа прямой нехирургической пересадки эмбрионов крупного рогатого скота, а также совершенствование существующих позволит дифференцированно подойти к методике криоконсервирования биоматериала: отбору клеток, подбору криофилактиков, поддерживающих сред и их соотношения для замораживания и оттаивания зародышей различных стадий развития, скорости снижения температуры; упростить методику деконсервирования клеток, что обеспечит возможность проводить эмбриопересадки любому специалисту, владеющему техникой ректоцервикального осеменения коров и телок.

В связи с этим целью наших исследований явилось совершенствование метода прямой пересадки эмбрионов с использованием различных криофилактиков.

Материал и методика исследований. Исследования проведены в РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству», а также в племенных хозяйствах Республики: ГП «Племенной завод Кореличи» Гродненской области, ГП «Племенной завод Красная Звезда», РДУП «ЖодиноАгроПлемЭлита», СПК «Агрокомбинат Снов» Минской области. В качестве доноров эмбрионов использовались клинически здоровые коровы белорусской черно-пестрой породы в возрасте от 4 до 8 лет, живой массой 550-650 кг с удоем по наивысшей лактации не ниже 9000 кг молока в год, жирностью 3,6 % и более. Для вызывания суперовуляции коровам-донорам инъецировали гонадотропные препараты – ФСГ-супер (Россия) или PLUSET (Франция) в сочетании с аналогом простагландина $F_2\alpha$ в дозе 750 мкг. Гонадотропин инъецировали на 9-11 день полового цикла в течение 4 дней дважды с интервалом между обработками 12 часов при наличии хорошо выраженного желтого тела. Контроль охоты проводили дважды в день по наличию рефлекса неподвижности. Коров-доноров осеменяли замороженно-оттаянной спермой с интервалом 10-12 часов [4]. Извлечение эмбрионов проводили на 7-й день после первого осеменения нехирургическим способом с использованием двухканальных катетеров фирмы «Нойштадт» (ФРГ). Кормление подопытных животных осуществлялось по рационам, принятым в хозяйствах.

С целью изучения степени влияния различных криопротекторов на жизнеспособность зародышей крупного рогатого скота применяли стандартные криофилактики – 1,4М глицерин и 1,5М этиленгликоль (EMCARE). Замораживанию подвергали эмбрионы отличного и хорошего качества на программном замораживателе CryoLogic CL-8800. Для определения оптимального соотношения питательных сред, проникающих и непроникающих (сахароза) криофилактиков в пайеттах

при криоконсервировании зародышей, были сформированы 4 группы эмбрионов. В I опытной группе последовательность растворов при заправке эмбриона в пайетту для криоконсервирования была следующей: поддерживающая среда, сахароза 0,5М, глицерин 1,4М или 1,5М этиленгликоль с эмбрионом, поддерживающая среда (Holding) в соотношении 1:1:1:1. Во II опытной группе заправка эмбриона в пайетту осуществлялось следующим способом: поддерживающая среда, сахароза 1М, глицерин 1,4М или 1,5М этиленгликоль с эмбрионом, поддерживающая среда в соотношении 1:1:1:1. В III опытной группе: поддерживающая среда, глицерин 1,4М или 1,5М этиленгликоль с эмбрионом, поддерживающая среда в соотношении 1:1:1. В IV опытной группе: поддерживающая среда, глицерин 1,4М или 1,5М этиленгликоль с эмбрионом, поддерживающая среда в соотношении 2:1:2. В качестве контроля служили зародыши аналогичных стадий развития, замороженные согласно методике криоконсервирования эмбрионов (2004 г.) [5]. Оттаивание зародышей контрольной и опытных групп проводили по общепринятой методике. Регидратацию зародышей контрольной группы осуществляли по 4-ступенчатой схеме согласно методическим рекомендациям по криоконсервированию эмбрионов крупного рогатого скота [5]. Пайетты с биоматериалом опытных групп после оттаивания встряхивали для смешивания растворов внутри соломинки и выдерживали при температуре 37 ºС в течение 5-15 минут. После этого пайетту вскрывали и под 56-63-кратном увеличении микроскопа оценивали качество деконсервированного эмбриона. Хорошее или отличное качество извлеченного из пайетты зародыша позволяло сделать заключение о целесообразности прямой, без удаления криопротектора, пересадки эмбриоматериала.

Полученные экспериментальные данные были биометрически обработаны общепринятыми методами вариационной статистики.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Сохранность эмбрионов, замороженных с использованием различных криопротекторов, представлена в таблице 1.

Установлено, что наибольшая выбраковка эмбрионов после оттаивания наблюдалась среди морул, замороженных в 1,4М глицерине (22,2 %). У зародышей аналогичной стадии развития, подвергнутых криоконсервированию в 1,5М этиленгликоле, данный показатель был на 13,1 % меньше и составил 9,1 %. В целом, полноценными по первой и второй группам морул было признано 77,8 и 90,9 % клеток, соответственно. По группе бластоцист, замороженных в 1,4М глицерине, пригодными к пересадке после оттаивания оказалось 81,8 % клеток. Использование в качестве криопротектора 1,5М этиленгликоля способствовало сохранности эмбрионов аналогичной стадии развития в 100 %

случаев.

Таблица 1 – Сохранность деконсервированных зародышей в зависимости от применяемых криофилактиков

Показатели	Криоконсервирование в глицерине			Криоконсервирование в этиленгликоле		
	стадия развития		Всего	стадия развития		Всего
	MO	BL		MO	BL	
Заморожено эмбрионов, n	9	11	20	11	13	24
Оттаяно эмбрионов, n	9	11	20	11	13	24
Пригодных к пересадке, n	7±1,6	9±1,9	16±1,2	10±1,7	13±2,1	23±1,4
Сохранность, %	77,8	81,8	77,8	90,9	100	95,8

Таким образом, применение этиленгликоля для криоконсервирования эмбрионов крупного рогатого скота позволяет в 95,8 % случаев сохранить их жизнеспособность после оттаивания, в отличие от использования для заморозки зародышей глицерина, сохранность которых после деконсервирования составила 77,8 %.

С целью изучения степени влияния поддерживающей среды, 0,5М и 1,0М сахарозы на качество оттаянных зародышей, предварительно замороженных в 1,4М глицерине, было сформировано 4 опытные группы. Сохранность клеток после оттаивания представлена в таблице 2. Установлено, что показатель жизнеспособности эмбриоматериала I опытной группы и контрольной существенно не отличался (81,8 против 84,6 %). При этом выбраковка зародышей наблюдалась на всех стадиях развития в пределах 16,7-20,0 %. Сохранность эмбриоматериала после деконсервирования во II опытной группе была выше на 6,3 % по сравнению с контрольной. При этом наблюдалось снижение количества жизнеспособных клеток всех возрастов, как в опытной, так и в контрольной группе на 14,3-16,7 %. Использование поддерживающей среды без добавления сахарозы не позволяет в должной мере обеспечить сохранность зародышей после оттаивания по сравнению с традиционным методом деконсервирования. В III опытной группе признано пригодными к трансплантации 75,0 % клеток, что на 9,6 % меньше, чем в контроле. При этом на стадии морулы и бластоцисты по причине гибели было выбраковано на 3,3 и 14,3 % эмбрионов больше, чем в контрольной, соответственно. Кроме этого установлено, что после оттаивания сохранность эмбриоматериала IV опытной группы и контрольной существенно не отличалась (83,3 против 84,6 %). При этом количество неполноценных зародышей на всех стадиях развития составило 14,3-20,0 %.

Таблица 2 – Сохранность замороженных в 1,4М растворе глицерина зародышей в зависимости от соотношения применяемых криозащитных сред

Показатели	I опытная группа			Контроль			II опытная группа			Контроль			III опытная группа			Контроль			IV опытная группа			Контроль		
	стадия развития		Всего	стадия развития		Всего	стадия развития		Всего	стадия развития		Всего	стадия развития		Всего	стадия развития		Всего	стадия развития		Всего	стадия развития		Всего
	МО	BL		МО	BL		МО	BL		МО	BL		МО	BL		МО	BL		МО	BL		МО	BL	
Заморожено эмбрионов, n	6	5	11	6	7	13	6	5	11	6	7	13	5	7	12	6	7	13	5	7	12	6	7	13
Оттаяно эмбрионов, n	6	5	11	6	7	13	6	5	11	6	7	13	5	7	12	6	7	13	5	7	12	6	7	13
Пригодных к пересадке, n	5	4	9	5	6	11	5	5	10	5	6	11	4	5	9	5	6	11	4	6	10	5	6	11
Сохранность, %	83,3	80,0	81,8	83,3	85,7	84,6	83,3	100	90,9	83,3	85,7	84,6	80,0	71,4	75,0	83,3	85,7	84,6	80,0	85,7	83,3	83,3	85,7	84,6

Далее нами был изучен качественный состав оттаянных эмбрионов, предварительно замороженных с различным сочетанием 1,4М раствора глицерина, сахарозы, поддерживающих и питательных компонентов. Полученные результаты исследований представлены в таблице 3. Данные таблицы указывают на то, что наибольшее снижение баллов после оттаивание (1,08 балла) наблюдалось в группе эмбрионов, замороженных без добавления сахарозы и в соотношении холдинга с криофилактиком 1:1:1. Добавление в поддерживающую среду 1М раствора глюкозы перед заморозкой зародышей позволяет признать пригодными к пересадке 90,9 % клеток после оттаивания при незначительном снижении их качества (на 0,27 балла). Необходимо отметить, что гибель клеток и снижение их качественного состава отмечено во всех подопытных группах эмбрионов, в том числе и в контроле. При этом не было отмечено достоверной разницы.

Итак, использование 1,4М глицерина в сочетании с 1М раствором сахарозы и поддерживающей средой возможно использовать при заморозке эмбрионов для их последующих пересадок реципиентам без выведения криопротектора после оттаивания.

С целью изучения степени влияния поддерживающей среды, 0,5М и 1,0М сахарозы на качество оттаянных зародышей, предварительно замороженных в 1,5М этиленгликоле было сформировано 4 опытные группы. Сохранность клеток после оттаивания представлена в таблице 4. Установлено, что сохранность эмбриоматериала I опытной группы и контрольной существенно не отличалась (84,6 против 90,9 %). При этом выбраковка зародышей наблюдалась на всех стадиях развития в пределах 14,3-16,7 %. Во II опытной группе сохранность на 7,6 % была ниже по сравнению с контрольной. Наблюдалось снижение количества жизнеспособных клеток на всех стадиях их развития, как в опытной, так и в контрольной группе, на 16,7 %. В III опытной группе признано пригодными к трансплантации 91,7 % клеток, что незначительно (на 0,8 %) выше, чем в контроле. При этом на стадии морулы контрольной и бластоцисты опытной группы по причине гибели было выбраковано 16,7 и 14,3 % эмбрионов, соответственно. После оттаивания сохранность эмбриоматериала IV опытной группы и контрольной существенно не отличалась (92,9 против 90,9 %). Выбраковка зародышей наблюдалась на стадии морулы в контроле и бластоцисты в опыте в пределах 16,7 и 14,3 %, соответственно.

Данные по качественному составу оттаянных эмбрионов, предварительно замороженных с различным сочетанием 1,5М раствора этиленгликоля, сахарозы, поддерживающих и питательных компонентов. Полученные результаты исследований представлены в таблице 5.

Таблица 3 – Влияние различного сочетания поддерживающих сред и концентрации сахарозы на качественный состав зародышей крупного рогатого скота, замороженных в 1,4М глицерине

Показатели		Контроль						I опытная группа						II опытная группа						III опытная группа						IV опытная группа					
		Стадия развития				Всего		Стадия развития				Всего		Стадия развития				Всего		Стадия развития				Всего		Стадия развития				Всего	
		МО		BL				МО		BL				МО		BL				МО		BL				МО		BL			
		До	После	До	После	До	После	До	После	До	После	До	После	До	После	До	После	До	После	До	После	До	После	До	После	До	После	До	После	До	После
Количество эмбрионов	n	6	6	7	7	13	13	6	6	5	5	11	11	6	6	5	5	11	11	5	5	7	7	12	12	5	5	7	7	12	12
	%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
в т. ч. отличных	n	4	3	5	4	9	7	5	4	5	3	10	7	5	5	5	4	10	9	4	2	5	3	9	5	5	4	5	4	10	8
	%	66,7	50,0	71,4	57,1	69,2	53,8	83,3	66,7		60,0	90,9	63,6	83,3	83,3	100	80	90,9	81,8	80,0	40,0	71,4	42,9	75,0	41,7	100	80,0	71,4	57,1	83,3	66,7
Хороших	n	2	1	2	1	4	2	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	2	1	3	1	0	0	2	1	2	1
	%	33,3	16,7	28,6	14,3	30,8	15,4	16,7	0	0	20,0	9,1	9,1	16,7	0	0	20	9,1	9,1	20,0	0	28,6	14,3	25,0	8,3	0	0	28,6	14,3	16,7	8,3
Удовлетворительных	n	-	1	-	1	-	2	-	1	-	0	-	1	-	0	-	0	-	0	-	2	-	1	-	3	-	0	-	1	-	1
	%	-	16,7	-	14,3	-	15,4	-	16,6	-	0	-	9,1	-	0	-	0	-	0	-	40,0	-	14,3	-	25,0	-	0	-	14,3	-	8,3
Неудовлетворительных	n	-	1	-	1	-	2	-	1	-	1	-	2	-	1	-	0	-	1	-	1	-	2	-	3	-	1	-	1	-	2
	%	-	16,6	-	14,3	-	15,4	-	16,7	-	20,0	-	18,2	-	16,7	-	0	-	9,1	-	20,0	-	28,5	-	25,0	-		-	14,3	-	16,7
Средний балл		4,67 ± 0,21	4,0 ± 0,52	4,71 ± 0,18	4,14 ± 0,46	4,67 ± 0,14	4,0 ± 0,35	4,8 ± 0,2	4,0 ± 0,63	5,0 ±	4,2 ± 0,58	4,91 ± 0,09	4,18 ± 0,38	4,83 ± 0,17	4,5 ± 0,5	5,0 ±	4,8 ± 0,2	4,91 ± 0,09	4,64 ± 0,28	4,8 ± 0,2	3,6 ± 0,6	4,71 ± 0,18	3,71 ± 0,52	4,75 ± 0,13	3,67 ± 0,38	5,0 ±	4,25 ± 0,75	4,67 ± 0,21	4,14 ± 0,46	4,83 ± 0,11	4,25 ± 0,35
Снижение баллов после оттаивания		0,67		0,57		0,67		0,8		0,8		0,73		0,33		0,2		0,27		1,2		1,0		1,08		0,75		0,53		0,58	

Таблица 4 – Сохранность замороженных в 1,5М растворе этиленгликоля зародышей в зависимости от соотношения применяемых криозащитных сред

Показатели	I опытная группа			Контроль			II опытная группа			Контроль			III опытная группа			Контроль			IV опытная группа			Контроль		
	стадия развития		Всего	стадия развития		Всего	стадия развития		Всего	стадия развития		Всего	стадия развития		Всего	стадия развития		Всего	стадия развития		Всего	стадия развития		Всего
	MO	BL		MO	BL		MO	BL		MO	BL		MO	BL		MO	BL		MO	BL		MO	BL	
Заморожено эмбрионов, n	6	7	13	6	5	11	6	6	12	6	5	11	5	7	12	6	5	11	7	7	14	6	5	11
Оттаяно эмбрионов, n	6	7	13	6	5	11	6	6	12	6	5	11	5	7	12	6	5	11	7	7	14	6	5	11
Пригодных к пересадке, n	5	6	11	5	5	10	5	5	10	5	5	10	5	6	11	5	5	10	7	6	13	5	5	10
Сохранность, %	83,3	85,7	84,6	83,3	100	90,9	83,3	83,3	83,3	83,3	100	90,9	100	85,7	91,7	83,3	100	90,9	100	85,7	92,9	83,3	100	90,9

Таблица 5 – Влияние различного сочетания поддерживающих сред и концентрации сахарозы на качественный состав оттаянных зародышей крупного рогатого скота, замороженных в 1,5М растворе этиленгликоля

Показатели		Контроль						I опытная группа						II опытная группа						III опытная группа						IV опытная группа					
		Стадия развития				Всего		Стадия развития				Всего		Стадия развития				Всего		Стадия развития				Всего		Стадия развития				Всего	
		МО		BL				МО		BL				МО		BL				МО		BL				МО		BL			
		До	После	До	После	До	После	До	После	До	После	До	После	До	После	До	После	До	После	До	После	До	После	До	После	До	После	До	После	До	После
Количество эмбрионов	n	6	6	5	5	11	11	6	6	7	7	13	13	6	6	6	6	12	12	5	5	7	7	12	12	7	7	7	7	14	14
	%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
в т. ч. отличных	n	4	2	3	2	7	4	4	2	4	2	8	4	5	2	4	2	9	4	3	2	5	4	8	6	6	5	6	4	12	9
	%	66,7	33,3		40,0	63,6	36,4	66,7	33,3	57,1	28,6	61,5	30,8	83,3	33,3	66,7	33,3	75,0	33,3	60,0	40,0	71,4	57,1	66,7	50,0	85,7	71,4	85,7	57,1	85,7	64,3
Хороших	n	2	2	2	2	4	4	2	2	3	2	5	4	1	1	2	1	3	2	2	3	2	2	4	5	1	1	1	1	2	2
	%	33,3	33,3		40,0	36,4	36,4	33,3	33,3	42,9	28,6	38,5	30,8	16,7	16,7	33,3	16,7	25,0	16,7	40,0	60,0	28,6	28,6	33,3	41,7	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3
Удовлетво-рительных	n	-	1	-	1	0	2	-	1	-	2	0	3	-	2	-	2	0	4	-	-	-	-	-	-	0	1	0	1	0	2
	%	-	16,7	-	20,0	0	18,1	-	16,7	-	28,6	0	23,0	-	33,3	-	33,3	0	33,3	-	-	-	-	-	-	0	14,3	0	14,3	0	14,3
Неудовлет-ворительных	n	-	1	-	-	0	1	-	1	-	1	0	2	-	1	-	1	0	2	-	-	0	1	0	1	-	-	0	1	0	1
	%	-	16,7	-	-	0	9,1	-	16,7	-	14,2	0	15,4	-	16,7	-	16,7	0	16,7	-	-	0	14,3	0	8,3	-	-	0	14,3	0	7,1
Средний балл		4,67 ± 0,21	3,83 ± 0,48	4,6 ± 0,24	4,2 ± 0,37	4,64 ± 0,15	4,0 ± 0,3	4,67 ± 0,21	3,83 ± 0,48	4,57 ± 0,2	3,71 ± 0,42	4,62 ± 0,14	3,77 ± 0,3	4,83 ± 0,17	3,67 ± 0,49	4,67 ± 0,21	3,67 ± 0,49	4,75 ± 0,13	3,67 ± 0,33	4,6 ± 0,24	4,4 ± 0,24	4,71 ± 0,18	4,29 ± 0,42	4,67 ± 0,14	4,33 ± 0,26	4,86 ± 0,14	4,57 ± 0,3	4,86 ± 0,14	4,14 ± 0,46	4,86 ± 0,1	4,36 ± 0,27
Снижение баллов после оттаивания		0,84		0,4		0,64		0,84		0,86		0,85		1,16		1,0		1,08		0,2		0,42		0,34		0,29		0,72		0,5	

Установлено, что наибольшее снижение баллов после оттаивание (1,08 балла) наблюдалось в группе эмбрионов, замороженных с добавлением 1М сахарозы и в соотношении холдинга с криофилактиком 1:1:1:1. В то же время, исключение непроникающего криопротектора из схемы заморозки перед криоконсервированием зародышей позволяет признать пригодными к пересадке 91,7 % клеток после оттаивания при незначительном снижении их первоначального качества (на 0,34 балла). Необходимо отметить, что гибель клеток и снижение их качественного состава отмечено во всех подопытных группах эмбрионов, в том числе и в контроле. При этом не было отмечено достоверной разницы.

Можно заключить, что использование 1,5М раствора этиленгликоля в сочетании с поддерживающей средой в сочетании 1:1:1 или 2:1:2 позволяет использовать его при заморозке эмбрионов для их последующих пересадок реципиентам без выведения криопротектора после оттаивания.

Заключение. На основании полученных результатов проведенной научно-исследовательской работы можно сделать следующие выводы:

1. Усовершенствован метод прямой трансплантации зародышей крупного рогатого скота с использованием в качестве криопротекторов 1,4М раствора глицерина в сочетании с 1М раствором сахарозы или 1,5М раствора этиленгликоля и питательной среды в соотношении 1:1:1 или 2:1:2 при их замораживании, позволяющий в 90,9-100 % случаев сохранить жизнеспособность этих клеток после оттаивания с незначительным снижением первоначального качества.

2. Протоколы криоконсервирования биоматериала, предусматривающие применение в качестве криофилактиков глицерина, этиленгликоля, сахарозы и питательной среды в оптимальных соотношения при заправке зародышей в пайетты позволяют в должной мере сохранить их полноценность после оттаивания и использовать в технологии прямой пересадки.

Литература

1. Leibo, S. P. A one-step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos / S. P. Leibo // Theriogenology. – 1984. – Vol. 21. – P. 767-790.

2. Voelkel, S. A. Direct transfer of frozenthawed bovine embryos / S. A. Voelkel, Y. X. Hu // Theriogenology. – 1992. – Vol. 37(1). – P. 23-37.

3. Leibo, S. P. Direct transfer of cryopreserved cattle embryos in North America / S. P. Leibo, R. J. Mapletoft // In Proc. 17th Annual Convention of the American Embryo Transfer Association (AETA). – 1998. – P. 91-98.

4. Инструкция по искусственному осеменению коров и телок. – Мн., 1999. – 54 с.

5. Методические рекомендации по трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота / БелНИИЖ ; сост. : И. И. Будевич [и др.]. – Мн., 2004. – 33 с.

Поступила 15.03.2013 г.