

Оригинальная статья

УДК 611.08.24-002

**ОСОБЕННОСТИ РЕГРЕССИИ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ВОСПАЛЕНИЯ В ЛЕГКИХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ
ЛЕКАРСТВЕННО УСТОЙЧИВОМ ТУБЕРКУЛЕЗЕ В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ
ПРЕПАРАТОВ РАЗЛИЧНОГО МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ**

М.Л. Витовская¹, Т.И. Виноградова¹, Н.В. Заболотных¹, Б.М. Ариэль¹, Д.С. Суханов², Р.А. Щеголева¹

¹ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава РФ

²ФГБОУ ВПО «СПбСЗГМУ им. Мечникова» Минздрава РФ

**REGRESSION OF TUBERCULOSIS INFLAMMATION IN THE LUNGS IN EXPERIMENTAL DRUG-RESISTANT
TUBERCULOSIS IN CONDITIONS OF APPLICATION OF PATHOGENIC DRUGS
OF DIFFERENT MECHANISM OF ACTION**

M.L. Vitovskaya, T.I. Vinogradova, N.V. Zabolotnyh, B.M. Ariel, D.S. Sukhanov, R.A. Shegoleva

Резюме:

исследовано влияние истинных иммунокорректоров и препаратов метаболического действия на регрессию воспалительных изменений в легочной ткани при экспериментальном лекарственно устойчивом туберкулезе. Выявлена зависимость репаративных процессов в легочной ткани мышей и функционального состояния системы фагоцитов. Сделан вывод, что выраженность процессов восстановления легочной ткани определяется различными механизмами активации системы иммунитета у данных лекарственных средств.

Ключевые слова: экспериментальный лекарственно устойчивый туберкулез, истинные иммунокорректоры, препараты метаболического действия, регрессия воспаления, фагоцитоз макрофагов.

Resume

True immune correcting drugs and metabolically active drugs influence on inflammatory regression changes in lung tissue in experimental drug resistant tuberculosis was studied. Reparatory processes in mouse lung tissue were shown to be dependent on the functional state of phagocyte system. It was concluded that the intensity of the processes of lung tissue recovery was determined by different mechanisms of immune system activation by those drugs.

Key words: experimental drug resistant tuberculosis, true immune correcting drugs, metabolically active drugs, in-flammation regression, macrophage phagocytosis

Введение

Полноценное восстановление поврежденной легочной ткани при лечении туберкулеза имеет решающее значение для прогноза положительного исхода заболевания, поскольку дистрофические изменения, характерные для специфического воспаления, часто приводят либо к хронизации патологического процесса, либо к формированию грубоволокнистого рубца, являющегося причиной нарушения функции легких. Проблема полноценного восстановления воздушности легочной ткани становится особенно актуальной в связи с широким распространением туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью микобактерий к современным противотуберкулезным препаратам, при которой проводится массивная, часто неэффективная специфическая терапия, подавляющая иммунный ответ [6].

Иммунная система участвует в регуляции процессов репарации, обеспечивая сопряженность воспаления, регенерации и фиброза [10, 13]. Эта сопряженность реализуется благодаря взаимодействию макрофагов и фибробластов – ключевых клеток разрешения воспаления, и обеспечивается медиаторами межклеточного взаимодействия – цитокинами Th1 и провоспалительными цитокинами [5, 11, 12]. Угнетение иммунитета при туберкулезе непосредственно связано и с процессами заживления: выявлена прямая корреляция незавершенности фагоцитоза с хроническим течением специфического воспаления и развитием грубых морфологических изменений в легких [4].

Целесообразность применения патогенетических средств с различными механизмами действия (иммунокорректоры, гепатопротекторы и другие) в комплексной терапии туберкулеза доказана экспериментальными исследованиями, проведенными в СПб НИИФ [3]. В экспериментах на

здоровых (неинфицированных микобактериями) животных нами установлено, что препараты янтарной кислоты (ремаксол и рунихол) стимулируют репаративную регенерацию печеночной паренхимы, производное тиопозтинов глутоксим - регенерацию легочной и печеночной ткани, беталейкин (рекомбинантный IL-1 β) – легочной ткани [1, 2, 7, 8].

В этой связи, целью настоящего исследования явилась оценка влияния истинных иммунокорректоров и препаратов метаболического действия при их включении в этиотропную терапию на особенности регрессии туберкулезного воспаления в легочной ткани при лекарственно устойчивом туберкулезе у мышей.

Материалы и методы

Исследования проведены в 7 сериях экспериментов на 800 белых нелинейных мышьях-самцах массой 18-20 г, инфицированных в хвостовую вену 1×10^7 КОЕ клинического изолята №5419 СПб НИИФ, выделенного от больного впервые выявленным туберкулезом, с множественной лекарственной устойчивостью к изониазиду (10 мкг/мл), рифампицину (40 мкг/мл), стрептомицину (10 мкг/мл), этионамиду (30 мкг/мл). Во всех сериях экспериментов мыши получали химиотерапию, включающую изониазид (И) в высшей терапевтической дозе; амикацин (А), этамбутол (Е) и левофлоксацин (Fq) – в средних терапевтических дозах. Истинные иммунокорректоры назначали внутривентриально: ронколейкин (1 серия экспериментов) – в дозе 12,5 мг/кг, 5 инъекций через день; беталейкин (2 серия) - 0,1 мкг/кг, 1 раз в 3 дня (курс - 5 недель); бестим (3 серия) - 0,1 мкг/кг, 10 инъекций; циклоферон (4 серия) - 3,6 мг/кг, 3 раза в неделю, 6 недель. Препараты метаболического действия применяли в режимах: глутоксим (5 серия) - в дозе 40 мг/кг, подкожно (курс - 4 недели); ремаксол (6 серия) - 25 мг/кг внутривентриально, 14 введений, рунихол (7 серия) - в дозе 396 мг/кг, внутривентриально,

14 введений. Животных выводили из опыта через 8 недель от начала комплексной этиотропной терапии в соответствии с этическими принципами обращения с лабораторными животными «European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. CETS No. 123» и «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Минздрава СССР от 12.08.1977 г. №755). Определяли эффективность фагоцитоза перитонеальных макрофагов (пМФ) в отношении опсонизированных дрожжей рода *Saccharomyces cerevisiae* (1×10^7 клеток). По полученным данным вычисляли: фагоцитарную активность пМФ (ФА); фагоцитарное число (ФЧ); показатель завершенности фагоцитоза (ПЗФ) и индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ). Гистологическое исследование легких проводили на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, при увеличении $\times 300$, $\times 600$ и $\times 1500$ с помощью эргономичного микроскопа «Olympus BX45», снабженного программным обеспечением «Olympus DP-Soft». Результаты обработаны статистически с использованием непараметрического критерия U Вилкоксона-Манна-Уитни и Фишера.

Результаты

У зараженных лекарственно устойчивым штаммом №5419 СПб НИИФ нелеченных мышьях (контроль инфекции) исследование фагоцитоза пМФ выявило достоверное угнетение как поглотительной, так и переваривающей способности. В различных сериях экспериментов параметры поглотительной способности были снижены по сравнению с интактным контролем в 1,3 – 2,5 раза ($p < 0,05$), переваривающей – в 1,6 – 10,1 раза ($p < 0,01$, рисунок 1А). Параллельно при морфологической оценке легких регистрировали обширные очаги инфильтрации, сливающиеся между собой, с

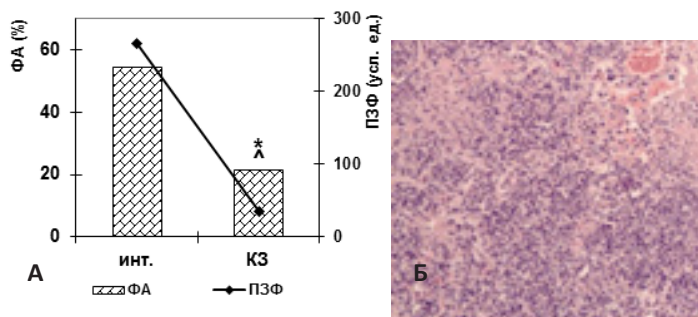


Рисунок 1А Фагоцитарная активность и показатель завершенности фагоцитоза у нелеченных зараженных мышьях; * достоверность с интактными мышьями по ФА; ^ - достоверность с интактными мышьями по ПЗФ; Б. Легкие мышьях на 34 день после заражения. Сливные очаги специфической инфильтрации без четкой пространственной ориентации клеток, с очагами сформированного некроза. Окраска гематоксилином и эозином $\times 300$.

Этиотропная терапия несколько уменьшила степень подавления эффективности фагоцитоза. Однако восстановление фагоцитарной функции не зарегистрировано ни по одному параметру, показатели поглотительной и переваривающей способности были значимо (в 1,3 – 7,8 раза, $p < 0,05$) снижены по сравнению с интактной группой (рисунок 2А)

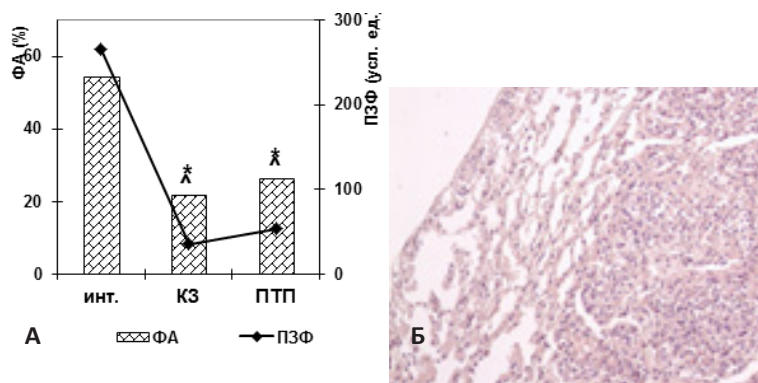


Рисунок 2А Показатели фагоцитоза пМф у мышей после курса этиотропной терапии (* - достоверно по сравнению с интактной группой по ФА; ^ - достоверно по сравнению с интактной группой по ПЗФ); Б. Очаг специфического гранулематоза в легких мыши после курса этиотропной терапии. Окраска гематоксилином и эозином x 300. интактной группой (рисунок 2А)

размытыми границами без четкой пространственной ориентации клеток, воздушность легочной ткани была снижена более чем на 30% площади среза, в 100% случаев обнаружены сформировавшиеся очаги некроза (рисунок 1Б). Найдены лишь единичные эмфизематозно расширенные альвеолы с сохранившейся воздушностью. Инfiltrация альвеол и межальвеолярных перегородок клетками лимфоцитарно-макрофагального ряда наблюдалась на фоне серозно-фибринозной экссудации. В клеточном составе специфических инfiltrатов наряду с лимфоцитами и эпителиоидными клетками определялись крупные скопления распадающихся нейтрофильных гранулоцитов. Во всех случаях скопления эпителиоидных клеток были очень крупными, лимфоциты же образовывали лишь узкое кольцо по периферии. Лимфогистиоцитарная инfiltrация была выражена очень слабо.

При гистологической оценке результатов этиотропной терапии выявлено, что, несмотря на существенное снижение распространенности туберкулезного поражения легочной ткани, в 50% наблюдений отмечались резко выраженные экссудативно-некротические изменения легочной ткани, значительное снижение ее воздушности (рисунок 2Б). В отличие от морфологической картины в контроле заражения очаги туберкулезного воспаления потеряли сливной характер, в них не выявлено сформированных некротических фокусов, в 50% случаев регистрировались отдельные мелкие очаги инfiltrации, в которых преобладали лимфоциты, макрофаги и эпителиоидные клетки. Единичные нейтрофильные гранулоциты и их скопления встречались реже (в 66,7% случаев), наблюдалось относительное снижение числа эпителиоидных гранул (в 50–66,7% случаев). Отмечена большая

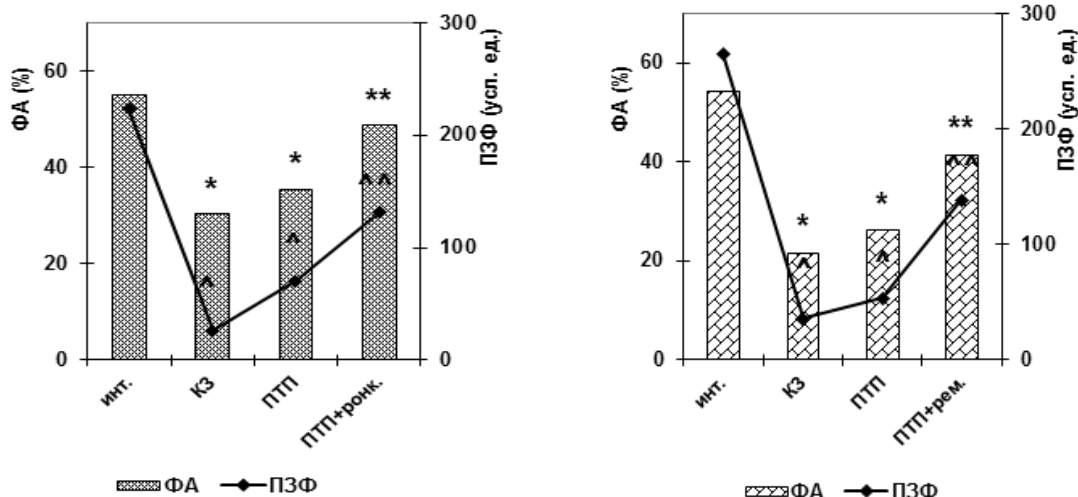


Рисунок 3А Влияние циклоферона на показатели фагоцитоза пМф, по ФА (* - достоверно по сравнению с интактной группой; ** - достоверно по сравнению с группой животных, получавших ПТП; по ПЗФ - ^ достоверно по сравнению с интактной группой; ^^ достоверно по сравнению с группой животных, получавших ПТП); Б. Влияние ремаксола на показатели фагоцитоза пМф; * - достоверно по сравнению с интактной группой по ФА; ^ - достоверно по сравнению с интактной группой по ПЗФ;

выраженность лимфогистиоцитарной инфильтрации, в основном, периваскулярной, а также незначительная перибронхиальная лимфогистиоцитарная инфильтрация.

Изучение параметров фагоцитарной функции пМФ показало, что все исследованные истинные иммунокорректоры достоверно стимулировали поглотительную и переваривающую способности пМФ, ингибиру-ванные самой туберкулезной инфекцией и специфической терапией (рисунок 3А). Так, ронколейкин и бестим способствовали достоверному повышению поглотительной активности пМФ (в 1,2 – 1,4 раза по сравнению с контролем терапии, $p < 0,05$), значимой стимуляции переваривающей способности (в 1,4 – 2,2 раза, $p < 0,05$). Применение беталейкина сопровождалось достоверным усилением переваривающей способности макрофагов в 1,7 – 2,1 раза ($p < 0,01$). Циклоферон стимулировал фагоцитарную активность пМФ в 1,4 раза [$p < 0,05$], переваривающую способность - в 1,8 – 2,3 раза ($p < 0,05$). Аналогичные тенденции выявлены и при использовании на фоне специфической терапии препаратов метаболитического действия: глутоксим и ремаксол стимулировали и поглотительную функцию пМФ (в 1,3 – 1,6 раза, $p < 0,05$) и их переваривающую

способность (в 1,6 – 2,6 раза, $p < 0,01$, рисунок 3Б).

Патоморфологическое исследование срезов легких мышей, получавших истинные иммунокорректоры и препараты метаболитического действия, показало, что препараты, имеющие различную направленность фармакологического действия, ускорили регрессию туберкулезного воспаления. Их использование привело к дальнейшему снижению распространенности специфического воспаления, уменьшению или исчезновению альтеративных и экссудативных изменений. Так, во всех сериях опытов снижение воздушности легочной ткани более чем на 30% площади среза регистрировалось значительно реже, чем в группе контроля лечения (от 0 до 33,3% наблюдений против 50%), специфическое воспаление было представлено преимущественно отдельными мелкими очагами инфильтрации. Выявлены отличительные особенности действия патогенетических препаратов: при использовании иммунокорректоров - отсутствие в изученных срезах крупных сливных очагов специфического воспаления, при назначении препаратов метаболитического действия – снижение частоты их визуализации до 0 – 33,3% (рисунок 4А, Б).

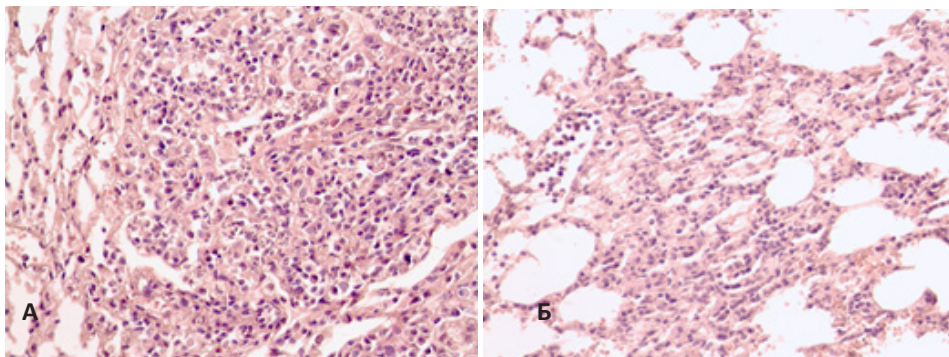


Рисунок 4А Крупный сливной очаг специфического гранулематоза в легких мыши после курса этиотропной терапии. Окраска гематоксилином и эозином $\times 300$. **Б.** Мелкий очаг специфического гранулематоза в легких мыши после курса этиотропной терапии и ронколейкина. Воздушность вокруг очага сохранена. Окраска гематоксилином и эозином $\times 300$.

В клеточном составе очагов туберкулезного воспаления у животных, леченных иммунокорректорами и препаратами метаболитического действия, преобладали лимфоциты, крупные вакуолизированные (пенистые) макрофаги и эпителиоидные клетки. Гораздо реже регистрировались единичные нейтрофильные гранулоциты и их скопления. Причем, при терапии

истинными иммунокорректорами ни в одном срезе легких не найдены даже единичные нейтрофильные гранулоциты (при 66,7% в группе контроля терапии, $p < 0,01$), а при назначении метаболитических средств единичные нейтрофильные гранулоциты и их скопления регистрировались в 5,3 раза реже, чем в группе контроля терапии ($p < 0,02$, рисунок 5А, Б).

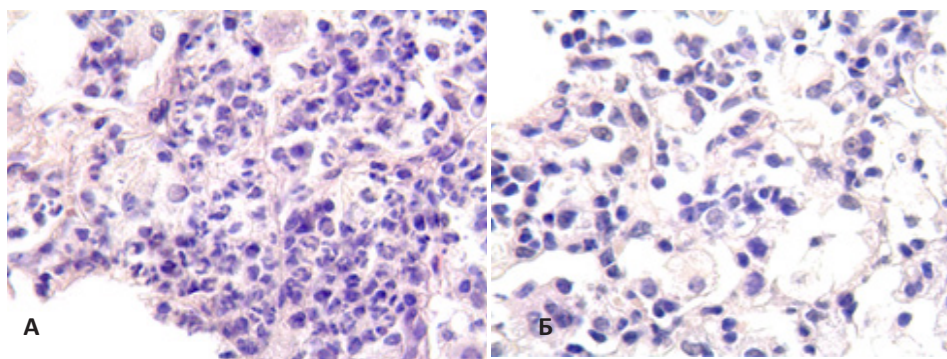


Рисунок 5А Клеточный состав специфических инфильтратов в легких мыши после курса этиотропной терапии. Наряду с пенистыми макрофагами, лимфоцитами и эпителиоидными клетками видны скопления распадающихся нейтрофильных гранулоцитов. Окраска гематоксилином и эозином $\times 1500$. **Б.** Клеточный состав инфильтратов в легких мыши после курса этиотропной терапии и беталейкина. Определяются лимфоциты, макрофаги, эпителиоидные клетки и пенистые макрофаги. Окраска гематоксилином и эозином $\times 1500$.

Под влиянием патогенетических средств в гранулемах наблюдалось снижение экссудации. Преимущественно эпителиоидно-клеточные гранулемы визуализировались в 3,0 – 6,0 реже, чем при этиотропной терапии ($p < 0,05$), причем у

мышей, получавших ронколейкин и ремаксол, такие гранулемы не обнаруживались. Отмечено также более частое наличие лимфоидных гранул (в 50 – 100% наблюдений против 0 – 16,7% в контроле терапии, рисунок 6А, Б).

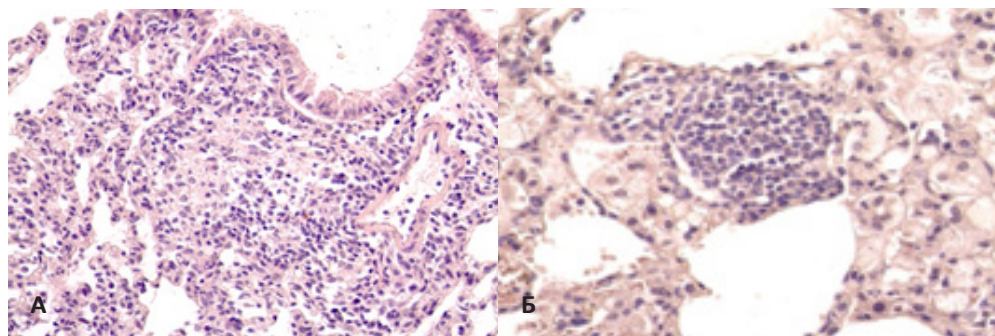


Рисунок 6А Легкое мыши по окончании курса этиотропной терапии. Преимущественно эпителиоидно-клеточная гранулема в очаге специфического гранулематоза, лимфоциты концентрически группируются вокруг крупного скопления эпителиоидных клеток. Окраска гематоксилином и эозином $\times 600$. **Б.** Лимфоидная гранулема в ткани легких мыши по окончании курса этиотропной терапии и ронколейкина. В очаге специфического гранулематоза большое количество пенистых макрофагов. Окраска гематоксилином и эозином $\times 600$.

В условиях применения исследованных препаратов значительно более выраженной стала лимфогистиоцитарная инфильтрация, являющаяся одним из признаков стимуляции местной иммунной реакции легких. Крупные периваскулярные лимфогистиоцитарные инфильтраты регистрировались в 1,2 – 5,0 раз чаще, чем в контроле лечения. Существенно увеличилась

распространенность лимфогистиоцитарной инфильтрации, преимущественно за счет перибронхиальной. Так, ронколейкин способствовал распространению этих инфильтратов до 83,3% случаев (при их отсутствии в контроле лечения, $p < 0,01$); беталейкин, бестим, циклоферон и ремаксол – в 2,0 – 5,0 раз (рисунок 7А, Б).

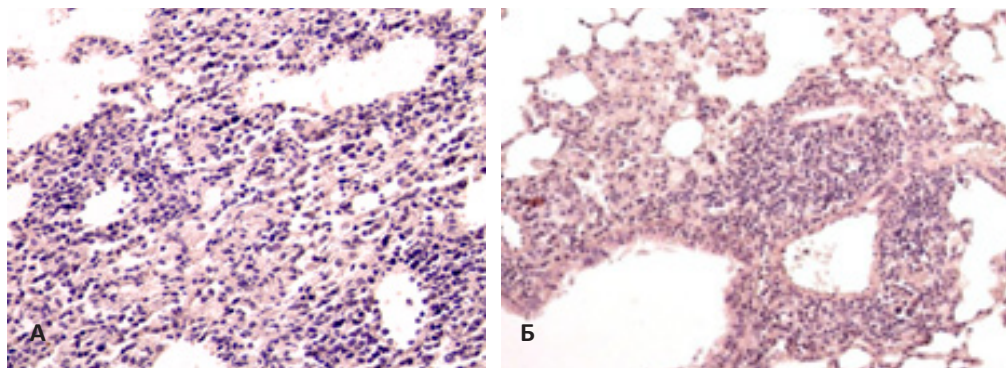


Рисунок 7А Очаг специфического гранулематоза в легких мыши после курса этиотропной терапии. Слабовыраженная периваскулярная лимфогистиоцитарная инфильтрация. Окраска гематоксилином и эозином x 600. **Б.** Крупные периваскулярные и перибронхиальные лимфогистиоцитарные инфильтраты в легких мыши после курса этиотропной терапии и ронколейкина. Окраска гематоксилином и эозином x 300.

Отдельно следует сказать о выявленных нами особенностях рунихола – препарата с преимущественно гепатопротекторным механизмом действия. Ранее нами показано, что рунихол при частичной гепатэктомии у здоровых крыс значительно повышал относительное содержание гепатоцитов, участвующих в репаративной регенерации печени, стимулировал внутриклеточные регенераторные реакции [9]. Это позволило нам сделать предположение о возможном благоприятном его влиянии на инволюцию туберкулезного процесса в легких. В ходе патоморфологических исследований легочной ткани мышей, получавших рунихол на фоне этиотропной терапии, выяснилось, что препарат практически не повлиял на распространение

специфического поражения в легких (рисунок 8А). Так, выраженное (более 30% площади среза) снижение воздушности легочной ткани у мышей, получавших рунихол, зафиксировано в 66,7% случаев (против 50% в контроле лечения). Не изменился и клеточный состав очагов инфильтрации, который включал в себя, наряду с лимфоцитами, макрофагами, эпителиоидными клетками, и нейтрофильные гранулоциты (в 50% наблюдений при 66,7% в контроле терапии). Гранулемы во всех случаях были довольно многочисленными, крупными и имели, как и в группе контроля лечения, преимущественно эпителиоидно-клеточный характер. Не изменилась под действием рунихола и выраженность лимфогистиоцитарной инфильтрации.

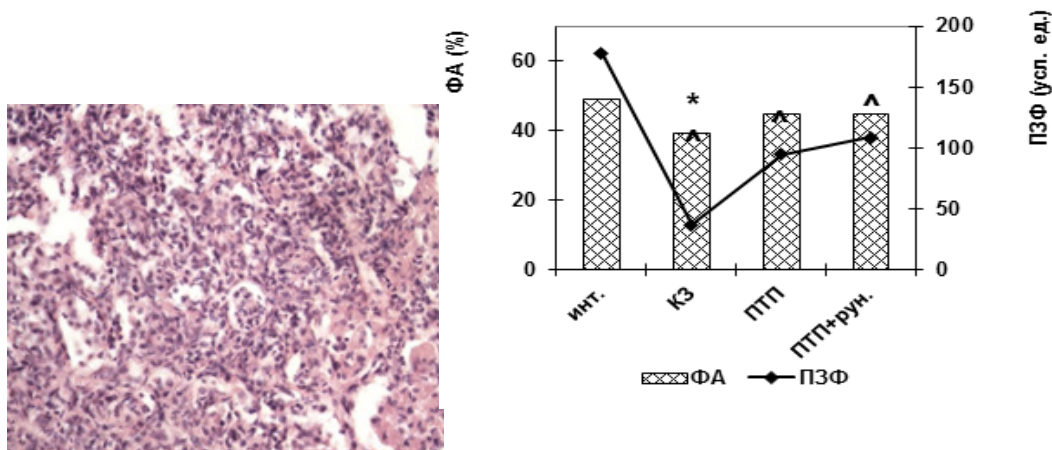


Рисунок 8А Очаг инфильтрации в легких мыши после курса этиотропной терапии и рунихола. Окраска гематоксилином и эозином x 300. **Б.** Показатели фагоцитоза пМф у мышей после курса этиотропной терапии и рунихола; * - достоверно по сравнению с интактной группой по ФА; ^ - достоверно по сравнению с интактной группой по ПЗФ.

Необходимо отметить, что рунихол практически не оказал воздействия и на поглотительную и переваривающую функцию пМФ, параметры которой были сопоставимы с группой контроля химиотерапии и достоверно ниже, чем у интактных мышей ($p < 0,01$, рисунок 8Б).

Выводы

Таким образом, исследованные истинные иммунокорректоры (ронколейкин, беталейкин, бестим, циклоферон) и препараты метаболического действия (глутоксим и ремаксол) характеризуются однонаправленным положительным воздействием на регрессию воспалительного процесса в легочной ткани при экспериментальном лекарственно устойчивом туберкулезе. Они восстанавливают показатели поглотительной и переваривающей способности пМФ, снижают распространенность специфического процесса, нивелируют признаки альтерации, активируют продуктивный компонент специфического воспаления - изменяют клеточный состав гранулем с преимущественно эпителиоидного на преимущественно лимфоидный, стимулируют местный иммунитет легочной ткани – усиливают лимфогистиоцитарную инфильтрацию.

Выявлены особенности рунихола – лекарственного средства с преимущественно гепатопротекторным механизмом действия. Этот препарат не оказывал влияния на фагоцитарную функцию пМФ, не изменял характер восстановления легочной ткани в ходе обратного развития туберкулезного воспаления. Полученные данные позволяют заключить, что ускорение репаративных процессов при регрессии туберкулезного воспаления в легких обусловлено иммуностимулирующим действием исследованных препаратов, выраженность которого определяется различием в механизмах активации системы иммунитета.

Результаты нашего исследования являются дополнительным обоснованием для широкого применения во фтизиатрии патогенетических препаратов, обладающих иммуностимулирующим эффектом, особенно в условиях ежегодного увеличения числа больных МЛУ туберкулезом.

Список литературы:

1. Васильева С.Н. Экспериментальное обоснование использования глутоксима в качестве средства сопровождения этиотропной терапии генерализованного туберкулеза: Автореф. дис. ...канд.

мед. наук. – СПб., 2004

2. Виноградова Т.И., Суханов Д.С., Заболотных Н.В., Коваленко А.Л., Васильева С.Н., Романцов М.Г. Сравнительная оценка влияния ремаксолола и адеметионина на репаративно-регенераторные процессы печени в условиях хирургического вмешательства в эксперименте // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2011. – Т. 74, № 2. – С. 34-38.

3. Заболотных Н.В., Виноградова Т.И. Действие рИЛ-1-β [беталейкина] и рИЛ-2 [ронколейкина] на процессы репаративной регенерации. //Мед. иммунология. – 2002. – Т.4, №2. – С. 122.

4. Ерохин В.В. О некоторых механизмах патогенеза туберкулеза // Туберкулез и болезни легких. – 2009. - №11. – С. 3 – 8.

5. Мусина Л. А. Функциональная морфология макрофагов при регенерации тканей, индуцированной аллогенными биоматериалами: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – СПб., 2007. – 35 с.

6. Суркова Л.К., Шаповалова Н.С., Дюсюмиева М.И. и др. Продукция цитокинов и функциональное состояние альвеолярных макрофагов в очаге воспаления у больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью // Мед. иммунология. – 2006. – Т.8, №2-3. – С. 292-293.

7. Суханов Д.С., Виноградова Т.И., Заболотных Н.В., Васильева С.Н., Коваленко А.Л., Романцов М.Г. Влияние сукцинатсодержащих препаратов на процессы репаративной регенерации печени в эксперименте // Хирургия. Журнал имени Н.И. Пирогова. 2011. - № 1. –С.56-60.

8. Суханов Д.С., Виноградова Т.И., Заболотных Н.В., Васильева С.Н., Романцов М.Г., Коваленко А.Л. Изучение действия ремаксолола и адеметионина на процессы репаративной регенерации печени в эксперименте // XVШ Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»: Сб. материалов конгресса. – М., 2011. – С.483.

9. Суханов Д.С., Виноградова Т.И., Заболотных Н.В., Коваленко А.Л., Васильева С.Н., Романцов М.Г. Влияние сукцинат- и метионин содержащего препарата «Рунихол» и адеметионина на процессы репаративной регенерации печени в условиях экспериментальной частичной гепатэктомии // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2012. – Т.75, №4. – С. 20-22.

10. Eming S.A., Hammerschmidt M., Krieg T. et al. Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration

// Semin Cell Dev Biol. -2009. – Vol.20, №5. – P.517-27.

11. Ge X., Ma X., Meng J. et al. Role of Wnt-5A in interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase expression in rabbit temporomandibular joint condylar chondrocytes / Arthritis Rheum. – 2009. – Vol.60, № 9. P.2714-2722.

12. Kim H.J., Song S.B., Choi J.M et al. IL-18

downregulates collagen production in human dermal fibroblasts via the ERK pathway // J. Invest. Dermatol. – 2010. – Vol.130, №3. - P.706-715.

13. Lorenzo J.A. Interaction between immune and born cells: new insights with many remaining questions // J. Clin. Invest. – 2000. - Vol. 106. – P. 749-752.



ТЫ МОЖЕШЬ!

1 СТАТЬ УМНЕЕ

У некурящих людей лучше работает мозг, развиты память и логическое мышление.

2 ОБРЕСТИ СВОБОДУ

Никотиновая зависимость – это добровольное рабство, которое забирает здоровье, деньги и будущее.

3 БЫТЬ ЗДОРОВЫМ И ИМЕТЬ ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ



**БЕСПЛАТНАЯ
ПОМОЩЬ**
в отказе от курения
8 800 200 0 200

**УЗНАЙ БОЛЬШЕ
КАК БЫТЬ ЗДОРОВЫМ**
www.takzdorovo.ru