

М.О. Клименко,
В.В. Золотухін

Харківський державний
медичний університет

Вплив низькоінтенсивного γ-випромінення на кістковий мозок при хронічному запаленні

The influence of low-dose gamma-radiation
on the bone marrow at chronic inflammation

Цель работы: Изучить влияние низкоинтенсивного γ-излучения на костный мозг при хроническом воспалении.

Материалы и методы: Работа выполнена на 96 крысах-самцах линии Вистар. Хроническое воспаление вызывали введением 4 мл 2 %-го раствора карагинена в предварительно подготовленный подкожный воздушный мешок. Облучение проводили к 3-м и 7-м суткам воспаления в дозах 0,1, 0,5 и 1,0 Гр при мощности дозы 20 мГр/ч. Оценивали общее количество клеток (ОКК) и клеточный состав костного мозга.

Результаты: Достоверное увеличение ОКК в костном мозге наблюдается при облучении к 3-м сут. воспаления в дозах 0,1 и 1,0 Гр и забое сразу после облучения. Усиление пролиферации гранулоцитов происходит при облучении к 3-м сут. воспаления в дозе 0,1 Гр и забое сразу после облучения, а доза 0,5 Гр при этом угнетает пролиферацию, а также обуславливает аналогичный отсроченный эффект. Созревание гранулоцитов усиливается при облучении к 3-м сут. воспаления в дозе 1,0 Гр и забое сразу после облучения; при таких условиях доза 0,5 Гр дает аналогичный отсроченный эффект. При облучении к 7-м сут. воспаления немедленное стимулирующее влияние на созревание гранулоцитов оказывают дозы в 0,1 и 0,5 Гр. Пролиферация моноцитов усиливается при облучении к 3-м сут. в дозах 0,1 и 1,0 Гр и забое сразу после облучения; доза 0,5 Гр приводит к отсроченному угнетающему эффекту (на 7-е сут.). При облучении к 7-м сут. воспаления отсроченный (к 14-м сут.) стимулирующий эффект оказывает доза 0,1 Гр. Количество лимфоцитов в костном мозге увеличивается при облучении к 3-м сут. воспаления при дозе 1,0 Гр и забое сразу после облучения. При облучении к 7-м сут. воспаления в дозе 1,0 Гр наблюдается отсроченный (к 14-м сут.) угнетающий эффект.

Выводы: Низкоинтенсивное γ-излучение в дозах 0,1, 0,5 и 1,0 Гр значительно влияет на костный мозг при хроническом воспалении. Большой эффект наблюдается при облучении в более ранний срок воспаления (к 3-м сут.), чем в более поздний (к 7-м сут.). Отмечается дозозависимость радиационного влияния на костномозговые клетки, немедленные и отсроченные эффекты облучения. Показана эффективность низкой дозы (0,1 Гр), которая способна значительно усилить пролиферацию гранулоцитов и моноцитов, созревание гранулоцитов.

Ключевые слова: хроническое воспаление, низкоинтенсивное гамма-излучение, костный мозг.

Objective: To study the influence of low-dose gamma-radiation on the bone marrow at chronic inflammation.

Material and Methods: The study involved 96 male Wistar rats. Chronic inflammation was induced by injection of 4 ml 2% carrageenan to the preliminary prepared subcutaneous air sac. The animals were irradiated on day 3 and 7 of the inflammation at a dose of 0.1, 0.5, 1.0 Gy (dose rate 20 mGy/h). Total cell amount (TCA) and cellular composition of the bone marrow were investigated.

Results: Significant increase in TCA in the bone marrow was noted on day 3 at a dose of 0.1 and 1 Gy in the animals killed immediately after the exposure. Increased granulocyte proliferation took place on day 3 at a dose of 0.1 Gy and killing immediately after the exposure. A dose of 0.5 Gy inhibited proliferation and produced a similar delayed effect. Granulocyte maturation increased by day 3 at a dose of 1 Gy and killing immediately after the exposure. In these conditions a dose of 0.5 Gy provides a similar delayed effect. On exposure on day 7 of the inflammation doses of 0.1 and 0.5 Gy immediately stimulated granulocyte maturation. Monocyte proliferation increased on irradiation on day 3 at a dose of 0.1 and 1 Gy and killing immediately after the exposure. A dose of 0.5 Gy produced a delayed inhibiting effect (on day 7). At exposure on day 7 of the inflammation a delayed stimulating effect (day 14) was produced by a dose of 0.1 Gy. Lymphocyte amount in the bone marrow increased at exposure at a dose of 1 Gy by day 3 of the inflammation and killing immediately after the exposure. At exposure to 1 Gy by day 7 of the inflammation a delayed (by day 14) inhibiting effect was observed.

Conclusion: Low-dose gamma-radiation at a dose of 0.1, 0.5, and 1 Gy influences considerably the bone marrow in chronic inflammation. A greater effect is observed at exposure at earlier terms of inflammation (day 3) than in a later period (day 7). Dose dependence of the radiation influences the bone marrow cells. Immediate and delayed effects are noted. Efficacy of a low dose (0.1 Gy), which can increase granulocyte, monocyte proliferation and granulocyte maturation, is shown.

Key words: chronic inflammation, low-dose gamma-radiation, bone marrow.

Нині у проблемі радіаційних уражень набуло великого значення питання про вплив низькоінтенсивного іонізуючого випромінення (ІВ), що пов'язано з його канцерогенністю [1, 2].

У нашому дослідженні промодульована реалістична ситуація дії низькоінтенсивного γ-випромінення на фоні хронічного запалення. Відомо, що кровотворна тканина є однією з найбільш радіочутливих в організмі. Виявлено також, що в реалізації запалення вирішальну роль відіграє система крові [3, 4]. Про вплив низькоінтенсивного γ-випромі-

нення на систему крові та зростання кількості хронічних запальних захворювань свідчать численні епідеміологічні дослідження наслідків катастрофи на ЧАЕС та атомного бомбардування в Хіросімі та Нагасакі [5, 6]. Втім стан системи крові під впливом низькоінтенсивного γ-випромінення на фоні хронічного запалення досі залишається практично не вивченим.

Метою дослідження стало вивчення впливу низькоінтенсивного γ-випромінення на кістковий мозок при хронічному запаленні.

Методика дослідження

Робота виконана на 96 щурах-самцях лінії Вістар масою 180–200 г. Моделлю хронічного запалення було обрано карагіненове асептичне гранулематозне запалення, створене за методом «повітряного мішка». Під шкіру спини тварини вводили 8 мл стерильного повітря. Через 24 години в отриманий підшкірний мішок вводили 4 мл 2 %-го розчину λ -карагінену в ізотонічному розчині NaCl. Розчин карагінену стерилізували автоклавуванням при 121°C впродовж 15 хв. Усі процедури виконували під ефірною анестезією [7].

Для опромінювання використовували джерело гамма-випромінювання ОВ-6 (Німеччина, ^{137}Cs , ^{20}Ci , 14,3 мкГр/год на відстані 1 м). Така інтенсивність опромінювання відповідає радіаційним умовам, у яких перебували люди, що проживали в місцях ядерних катастроф. Тварини отримали дози 0,1, 0,5 і 1,0 Гр. Доза 0,1 Гр знаходиться в ділянці так званих «низьких» доз (нижче 0,2 Гр або 1 трек на ядро), які вважалися донедавна відносно безпечними; доза в 1,0 Гр є класичною радіобіологічною дозою, ефекти якої добре вивчені при гострому опроміненні; доза в 0,5 Гр знаходиться в ділянці між зазначеними вище. Щурів першої серії опромінювали до 3-ї доби запалення. Тварин забивали декапітацією під ефірним наркозом відразу після опромінювання і на 7-му добу запалення. Тварин другої серії опромінювали до 7-ї доби. Забій проводили по закінченні опромінювання і на 14-ту добу запалення. Обрані для опромінювання терміни хронічного запального процесу відповідають пікам макрофагальної (3-тя доба) і фібробластичної (7-ма доба) реакцій [8]. Виходили з того, що радіаційна чутливість названих клітин, певно, максимальна саме в ці строки. Крім негайного ефекту дії гамма-випромінювання, становив інтерес і відстрочений ефект низькоінтенсивного опромінення. За контроль брали тварин, у яких викликали запалення, але опромінюванню не піддавали. Тварини всіх експериментальних груп перебували в однакових умовах, водний і харчовий режим — *ad libitum*.

Визначення загальної клітинності та клітинного складу кісткового мозку здійснювали за стандартними методами [9].

Статистично дані опрацьовували на комп'ютері IBM PC/AT Pentium 4 з використанням програми «Біостатистика» та критерію Стьюдента. Статистично вірогідними вважали результати з $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Вивчення загальної кількості клітин (ЗКК) у кістковому мозку показало її бімодальну залежність від дози при опромінюванні до 3-ї доби запалення та при забої відразу після закінчення опромінювання. Відзначено вірогідне збільшення ЗКК при дозах 0,1 та 1,0 Гр (рис. 1, а), що свідчить про стимулювальну дію таких доз на кровотворення. При забої на 7-му добу запалення ЗКК практично не змінювалася при всіх отриманих дозах (рис. 1, б), тобто відстроченого ефекту не спостерігалось. При опромінюванні до 7-ї доби запалення ЗКК на 7-му (рис. 1, в) та на 14-ту добу (рис. 1, г) запалення вірогідно не змінювалася, хоча на

7-му добу відзначалося її незначне зростання при дозах 0,1 та 0,5 Гр.

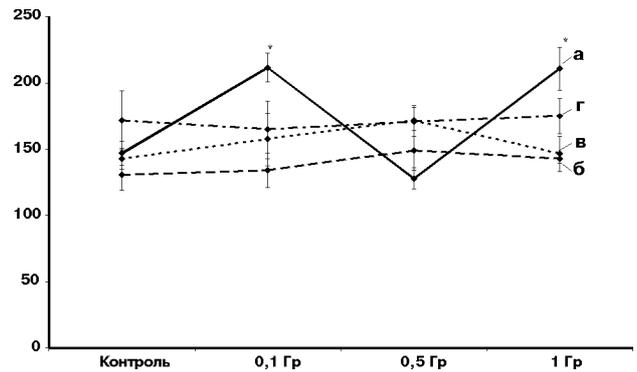


Рис. 1. ЗКК у кістковому мозку в залежності від дози опромінювання при опромінюванні до 3-ї доби і забої на 3-тю (а) та 7-му (б) добу та при опромінюванні до 7-ї доби і забої на 7-му (в) та 14-ту (г) добу від початку запалення

Fig. 1. TCA in the bone marrow depending on the dose at exposure on day 3 and killing on day 3 (a) and day 7 (b) and irradiation on day 7 and killing on day 7 (v) and day 14 (r) of the inflammation

Дослідження кількості незрілих гранулоцитів (КНГ) залежно від дози опромінення, отриманої до 3-ї доби запалення, та при забої відразу після опромінювання показало бімодальну залежність, тобто вірогідне збільшення при дозі 0,1 Гр та зниження при 0,5 Гр, що вказує на стимуляцію проліферації клітин при дозі 0,1 Гр та пригнічення при 0,5 Гр; доза 1,0 Гр практично не впливала на кількість гранулоцитів (рис. 2, а). При забої на 7-му добу запалення спостерігалось вірогідне зменшення КНГ при дозі 0,5 Гр, що свідчить і про відстрочене пригнічення проліферації клітин при цій дозі (рис. 2, б).

При опромінюванні до 7-ї доби запалення та забої на 7-му та 14-ту добу вірогідної залежності КНГ від дози γ -випромінювання не спостерігалось (рис. 2, в, г).

Кількість зрілих гранулоцитів (КЗГ) при опромінюванні до 3-ї доби та забої відразу після опромінювання дещо збільшувалася при дозі 0,1 Гр та вірогідно — при 1,0 Гр і залишалася практично незмінною при 0,5 Гр (рис. 3 а), що свідчить про стимулювання дозрівання гранулоцитів при дозі 1 Гр. При дослідженні відстроченого ефекту опромінювання у цих щурів (на 7-му добу запалення) відзначалася тенденція до збільшення КЗГ при дозах 0,1 та 1,0 Гр та вірогідне підвищення при дозі 0,5 Гр (рис. 3, б), що збігається зі зменшенням КНГ у цей час і при цій дозі та

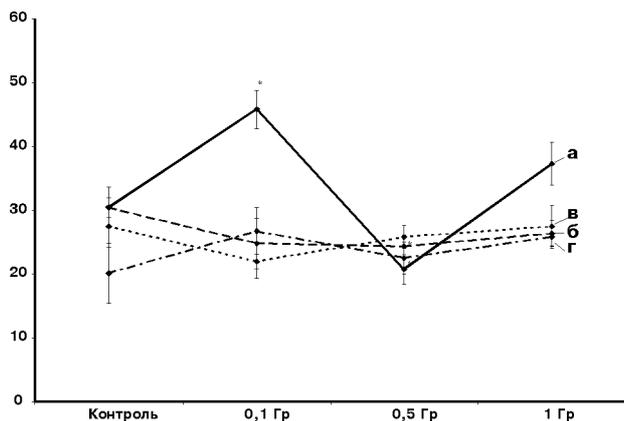


Рис. 2. Кількість незрілих гранулоцитів в кістковому мозку в залежності від дози опромінення при опромінюванні до 3-ї доби і забої на 3-тю (а) та 7-му добу (б) та при опромінюванні до 7-ї доби і забої на 7-му (в) та 14-ту (г) добу від початку запалення

Fig. 2. The amount of immature granulocytes the bone marrow depending on the dose at exposure on day 3 and killing on day 3 (a) and day 7 (б) and irradiation on day 7 and killing on day 7 (в) and day 14 (г) of the inflammation

вказує на те, що зростання КЗГ, імовірно, пов'язане з посиленням дозрівання незрілих гранулоцитів. При опромінюванні до 7-ї доби та забої відразу після опромінювання (рис. 3, в) спостерігалася вірогідне збільшення кількості клітин при дозах 0,1 та 0,5 Гр і незначне при 1,0 Гр, що також демонструє дозозалежну стимуляцію дозрівання гранулоцитів. На 14-ту добу запалення, як і у незрілих клітин, значної зміни КЗГ від дози отриманого γ -випромінення не спостерігалася (рис. 3, г).

Вивчення моноцитів показало, що при опроміненні до 3-ї доби та забої відразу після опромінювання спостерігалася бімодальна залежність кількості моноцитів (КМ) від дози γ -випромінення. Вона вірогідно збільшувалася при дозах в 0,1 Гр та 1,0 Гр й залишалася практично незмінною при 0,5 Гр (рис. 4, а), що може вказувати на те, що дози в 0,1 та 1,0 Гр стимулюють проліферацію моноцитів. На 7-му добу було зареєстроване вірогідне зниження КМ при дозі 0,1 Гр, отриманій до 3-ї доби (рис. 4, б). Це може пояснюватися подальшим зменшенням проліферації під впливом накопичуваних радіаційних продуктів або ж посиленням виходом моноцитів до крові та вогнища.

При опромінюванні в більш пізній термін (до 7-ї доби) КМ лише при дозі в 0,1 Гр збільшувалася незначно на 7-му добу (рис. 4, в) й вірогідно — на 14-ту добу (рис. 4, г), що

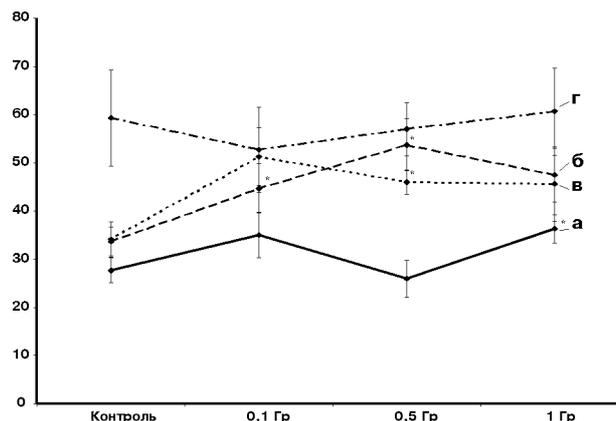


Рис. 3. Кількість зрілих гранулоцитів в кістковому мозку в залежності від дози опромінення при опромінюванні до 3-ї доби і забої на 3-тю (а) та 7-му добу (б) та при опромінюванні до 7-ї доби і забої на 7-му (в) та 14-ту (г) добу від початку запалення

Fig. 3. The amount of mature granulocytes the bone marrow depending on the dose at exposure on day 3 and killing on day 3 (a) and day 7 (б) and irradiation on day 7 and killing on day 7 (в) and day 14 (г) of the inflammation

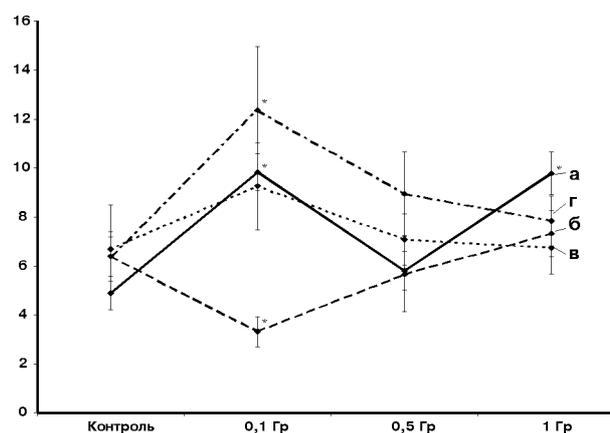


Рис. 4. Кількість моноцитів в кістковому мозку в залежності від дози опромінення при опромінюванні до 3-ї доби і забої на 3-тю (а) та 7-му добу (б) та при опромінюванні до 7-ї доби і забої на 7-му (в) та 14-ту (г) добу від початку запалення

Fig. 4. The amount of monocytes the bone marrow depending on the dose at exposure on day 3 and killing on day 3 (a) and day 7 (б) and irradiation on day 7 and killing on day 7 (в) and day 14 (г) of the inflammation

свідчить про стимулювальний ефект дози 0,1 Гр на проліферацію моноцитів й у цей строк, а також про відстрочений стимулювальний ефект, імовірно, пов'язаний з дією продуктів радіаційного впливу, що накопичуються.

Щодо лімфоцитів при опромінюванні до 3-ї доби та забої на 3-тю добу так само, як і для гранулоцитів та моноцитів, спостерігалася бімодальна залежність числа клітин від дози γ -випромінення. При дозі 0,1 Гр кількість клітин дещо зростала, при 1 Гр — вірогідно збільшувалася, а при дозі 0,5 Гр дещо змен-

шувалася кількість лімфоцитів (КЛ) (рис. 5, а). При забої на 7-му добу тварин, опромінених до 3-ї доби, відбувалося деяке збільшення кількості клітин при дозі 0,5 Гр (рис. 5, б). При опромінюванні до 7-ї доби запалення та забої на 7-му (рис. 5, в) спостерігалися тенденції до збільшення КЛ при 0,1 та 1 Гр, а при забої на 14-ту добу відзначалася тенденція до зменшення КЛ при дозі 0,5 Гр та вірогідне зменшення при дозі в 1 Гр (рис. 5, г), що вказує на зниження КЛ у відстрочені строки після опромінювання зі зростанням поглинутої дози.

Таким чином, низькоінтенсивне γ -випромінення у названих дозах значно впливає на кістковий мозок при хронічному запаленні. Виразніший ефект реєструється при опромінюванні в більш ранній термін запалення (до 3-ї доби), ніж у пізніший (до 7-ї доби), що, імовірно, пов'язано з інтенсивнішим гемопоезом і, відповідно, більшою радіочутливістю клітин. Так, при дослідженні клітинного складу кісткового мозку при карагіненовому асептичному запаленні, яке хронізується, і при первинно хронічному асептичному гранулематозному запаленні, спричиненому сефадексом, показано, що кровотворення найбільш активне у перші дні запалення з наступним зниженням його активності, що, певно, пов'язано зі зменшенням інтенсивності запалення [10, 11].

Спостерігаються дозозалежність радіаційного впливу на кісткомозкові клітини, бімо-

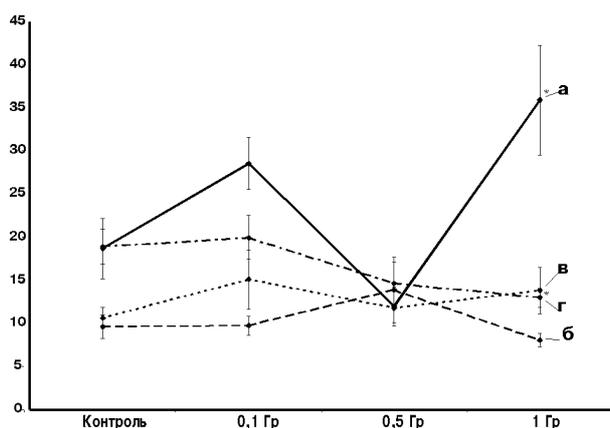


Рис. 5. Кількість лімфоцитів в кістковому мозку в залежності від дози опромінення при опромінюванні до 3-ї доби і забої на 3-тю (а) та 7-му добу (б) та при опромінюванні до 7-ї доби і забої на 7-му (в) та 14-ту (г) добу від початку запалення

Fig. 5. The amount of lymphocytes the bone marrow depending on the dose at exposure on day 3 and killing on day 3 (a) and day 7 (б) and irradiation on day 7 and killing on day 7 (в) and day 14 (г) of the inflammation

дальна або лінійна, зокрема ефективність низької дози (0,1 Гр); негайні та відстрочені ефекти опромінення. Так, вірогідне підвищення ЗКК в кістковому мозку виявлено при опромінюванні до 3-ї доби запалення в дозах 0,1 та 1 Гр і забої відразу після опромінювання. Посилення проліферації гранулоцитів відбувається при опромінюванні до 3-ї доби запалення в дозі 0,1 Гр і забої відразу після опромінювання, а при дозі в 0,5 Гр при цьому пригнічується проліферація та залишається аналогічний відстрочений ефект. Дозрівання гранулоцитів посилюється при опромінюванні до 3-ї доби запалення в дозі 1 Гр і забої відразу після опромінювання; за таких умов при дозі 0,5 Гр спостерігається аналогічний відстрочений ефект. При опромінюванні до 7-ї доби запалення негайний стимулювальний вплив на дозрівання гранулоцитів здійснюється при дозах 0,1 і 0,5 Гр. Проліферація моноцитів посилюється при опромінюванні до 3-ї доби в дозах 0,1 і 1 Гр і забої відразу після опромінювання; при дозі 0,5 Гр є відстрочений пригнічувальний ефект (на 7-му добу). При опромінюванні до 7-ї доби запалення відстрочений (на 14-ту добу) стимулювальний ефект проявляється при дозі 0,1 Гр. Кількість лімфоцитів у кістковому мозку зростає при опромінюванні до 3-ї доби запалення в дозі 1 Гр і забої відразу після опромінювання. При опромінюванні до 7-ї доби запалення в дозі 1 Гр спостерігається відстрочений (на 14-ту добу) пригнічувальний ефект.

Отримані дані про посилення проліферації та дозрівання гранулоцитів і проліферації моноцитів при опромінюванні, зокрема в низькій дозі (0,1 Гр), узгоджуються з даними про посилення проліферації макрофагів і фібробластів у вогнищі запалення при аналогічній постановці досліду [12]. У вогнищі запалення також спостерігаються дозозалежні, бімодальні й лінійні, ефекти.

Кількість лімфоцитів у вогнищі запалення, головним чином, зменшується [12], тоді як у кістковому мозку переважно має тенденцію до збільшення або вірогідно збільшується. Очевидно, це пов'язано з міграцією (хомінгом) лімфоцитів до кісткового мозку з лімфоїдних органів та крові для активації кровотворення [8]; зменшення КЛ у вогнищі може бути

наслідком лімфопенії або ж порушення їх еміграції. При вивченні КЛ у кістковому мозку при опромінюванні до 7-ї доби та забої на 14-ту добу відзначається її зменшення, за цих же умов вона зростає у вогнищі запалення [12]; це, певно, пов'язано з виходом лімфоцитів з кісткового мозку до крові та їх еміграцією до вогнища запалення.

Як відомо, взагалі йонізуювальне випромінювання вважається класичним фактором, що пригнічує як проліферацію, так і дозрівання клітин, у першу чергу, лімфоїдних та кістковомозкових. Зазвичай гальмівну дію γ -випромінювання на проліферативну здатність клітин пов'язують зі здатністю фотонів великої енергії ушкоджувати ДНК за допомогою як комптонівських електронів, так і активних форм кисню, утворених унаслідок радіолізу води. Загибель клітин відбувається в результаті активації білків-регуляторів геному, які призводять до апоптозу клітин з ушкодженою ДНК або до виключення цих клітин з клітинного циклу у фазу спокою G_0 , унаслідок чого зменшується ЗКК, які поділяються, та загальний темп проліферації. Даний механізм загибелі клітин, очевидно, має місце при досить великій потужності та при високій дозі, коли відбувається ушкодження ДНК з двонитковими розривами, які не підлягають відновленню та, зазвичай, стимулюють регуляторну систему геному до ліквідації цих клітин, що пояснює зниження кількості клітин при більш високих дозах γ -випромінювання. Але водночас для відновлення ЗКК запускаються механізми, які стимулюють утворення нових клітин, чим можна пояснити тимчасове збільшення їх кількості при високих дозах γ -випромінювання, хоча це, очевидно, не може компенсувати ту кількість клітин, які були виведені регуляторною системою геному.

Дія γ -випромінювання з малою потужністю та при низькій дозі, напевне, менше ушкоджує ДНК, а кількість активних форм кисню, які накопичуються внаслідок радіолізу води, є досить малою і не сягає величини, здатної спричинити значне ушкодження ДНК. Таким чином, можна припустити, що опромінення при низьких дозах з малою потужністю викликає настільки незначну кількість ушкоджень ДНК, з переважно одноститковими розривами, які можуть репарувати, що, відповідно, регуляторні

системи геному, відповідальні за ліквідацію клітин, зовсім не включаються чи слабко виражені. Зважаючи на викладене вище, можна припустити, що активація регуляторів геному має певний поріг, недосяжний при низькій потужності та при дозі 0,1 Гр. Відповідно, інтенсивність проліферації не тільки не послаблюватиметься, а й під дією активних форм кисню, що утворилися внаслідок радіолізу води, посилюватиметься.

Висновки

1. Низькоінтенсивне γ -випромінювання в дозах 0,1, 0,5 та 1 Гр значно впливає на кістковий мозок при хронічному запаленні. Виразніший ефект спостерігається при опромінюванні в більш ранній термін запалення (до 3-ї доби), ніж у пізніший (до 7-ї доби), ймовірно, у зв'язку з інтенсивнішим гемопоезом і, відповідно, більшою радіочутливістю клітин.

2. Спостерігаються дозозалежність радіаційного впливу на кістковомозкові клітини, бімодальна або лінійна, негайні та відстрочені ефекти опромінення. Ефективне опромінення в низькій дозі (0,1 Гр), здатне значно посилювати проліферацію гранулоцитів і моноцитів, дозрівання гранулоцитів.

Література

1. Murthy S., Winkler J.D. // *Inflamm. Res.* — 2002. — Vol. 51. — P. 76.
2. Ames B.N., Swirsky Gold L., Willett W.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1995. — Vol. 92. — P. 5258–5265.
3. Пауков В.С., Салтыков Б.Б., Ермакова Н.Г. и др. // *Арх. патол.* — 1998. — № 1. — С. 34–38.
4. Серов В.В., Пауков В.С. *Воспаление.* — М.: Медицина, 1995. — 640 с.
5. Denis L. Henshaw // *Brit. Med. J.* — 1996. — Vol. 312. — P. 1052–1053.
6. Preston D., Hiroo K. // *Radiat. Res.* — 1986. — Vol. 111. — P. 151–178.
7. Ghosh A.K., Hirasawa N., Niki H., Ohuchi K. // *J. Pharmacol. and Exp. Ther.* — 2000. — Vol. 295. — P. 802–809.
8. Дыгай А.М., Клименко Н.А. *Воспаление и гемопоез.* — Томск, 1992. — 276 с.
9. *Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова.* — М.: Медицина, 1987. — 368 с.
10. Клименко Н.А., Шевченко А.Н. // *Клін. та експерим. патол.* — 2004. — Т. 3, № 1. — С. 44–48.
11. Клименко Н.А., Шевченко А.Н. // *Укр. мед. альманах.* — 2004. — Т. 7, № 2. — С. 94–96.
12. Клименко М.О., Онищенко М.І. // *Фізіол. журн.* — 2004. — Т. 50, № 6. — С. 88–94.

Надходження до редакції 03.01.2006.

Прийнято 17.01.2006.

Адреса для листування:

Клименко Микола Олексійович,
ХДМУ, пр-т Леніна, 4, Харків, 61022, Україна