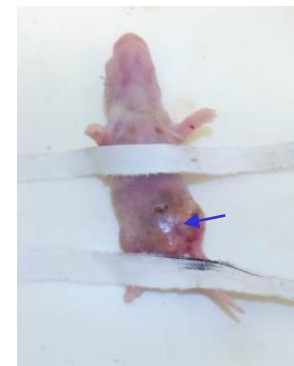




# **Отчет за 2015 г.**



***Тема 22: «Изучение молекулярно-генетических, нейроэндокринных и психологических основ функциональной организации и регуляции репродуктивной системы и полового развития детей и подростков»***

***Руководитель темы: Никитина И.Л.***

**Цель этапа за отчетный период: изучение некоторых нейроэндокринных механизмов регуляторного сигналинга в пределах функциональной активности гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси в эксперименте, а также психологическая оценка полоролевого фенотипа у лиц с различными нозологическими вариантами нарушения формирования пола.**

## **Задачи этапа исследования**

- 1.1. Исследовать влияние лиганд-рецепторной системы киспептина на пубертатную реактивацию гонадной оси в эксперименте.***
- 1.2. Оценить влияние изменений андрогенового статуса на киспептиновый сигналинг в периферических стероидзависимых тканях в экспериментальной модели мужского гипогонадизма.***
- 1.3. Изучить психологическую полоролевою самоидентификацию у детей с различными нозологическими вариантами НФП.***

# **Экспериментальный и клинический материал**

## **1. Экспериментальный материал – крысы линии Wistar**

| <b>№</b> | <b>группы</b>                                       | <b>Количество особей</b> |
|----------|-----------------------------------------------------|--------------------------|
| 1        | хирургическая модель 2 мес                          | 7                        |
| 2        | хирургическая модель 4 мес                          | 8                        |
| 3        | комбинированная модель 4 мес                        | 8                        |
| 4        | хирургическая модель 4 мес с лечением тестостероном | 8                        |
| 5        | контроль 1 мес (интактные)                          | 8                        |
| 6        | контроль 2 мес (интактные)                          | 7                        |
| 7        | контроль 4 мес (интактные)                          | 6                        |

## **2. Дети с НФП (гонадный дисгенез, резистентность к андрогенам, ВГКН, дефицит 5-альфаредуктазы) – 11 чел.**

## ***Методы:***

### ***Экспериментальная часть:***

1. Определение концентрации киспептиновых рецепторов в стероидзависимых тканях (гонады, мышцы) после предварительной гомогенизации и получения супернатанта, методом твердофазного иммуноферментного анализа на аппарате Synergy 2 (BioTek USA) и сравнивали с приготовленными стандартами на аппарате вертикального оптического абсорбциометра-монокроматора BioTek Synergy 2.
2. Определение концентрации тестостерона и киспептина в крови твердофазного иммуноферментного анализа на анализаторе Synergy 2 (BioTek USA) с использованием Elisa Kit набора (CSB-E05100rTestEnzyme-linkedImmunsorbentAsayKitForthe quantitative determination of rat testosterone concentrations, China).
3. Морфологическое исследование срезов медиального аркуатного ядра с последующим окрашиванием по Нислю, определением фенотипа нейронов по Ю.М.Жаботинскому, отдельным подсчетом неизмененных, гипохромных, сморщенных гиперхромных и тeneвидных клеток, установлением площади малоизмененных нейронов.

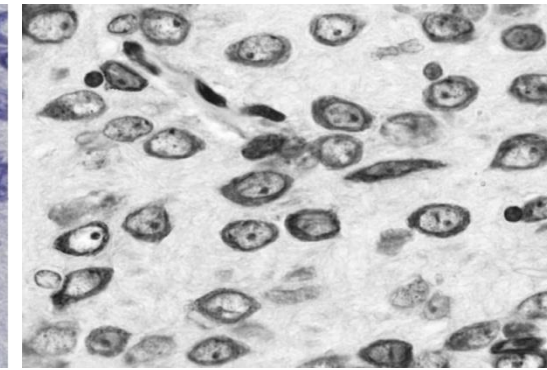
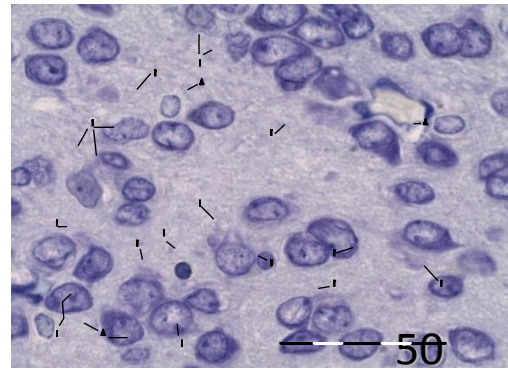
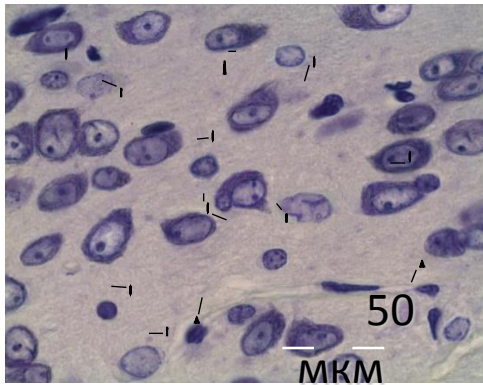
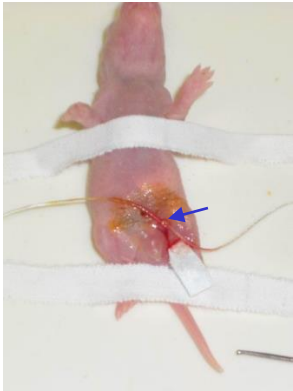
### ***Клиническая часть:***

1. Проведено психологическое тестирование по полоролевому опроснику БЭМ (BEM sex-role inventory, 1974) – установление фемининной, андрогинной, маскулинной полоролевой ориентации, а также тестирование по опроснику Р.Кеттэлл 91983) для установления психоэмоциональных характеристик личности.

*Математический анализ с использованием непараметрических методов – расчет критерия Вилкоксона, хи-квадрат*

# Результаты

Создана модель гипогонадотропного гипогонадизма у самцов крыс линии Wistar



Срезы медиального аркуатного ядра intactных и гипогонадных крыс (Окраска методом Ниссля, ок.х10, об. X 100)

**Нейроны аркуатного медиального ядра у intactных половозрелых крыс.**

Единичные измененные нейроны: Г-гипохромный, Т-клетки-«тени», другие обозначения: А-астроциты,

О-олигодендроциты. Неизменные (нормохромные) нейроны не обозначены.

**Реактивные изменения нейронов аркуатного медиального ядра у взрослых крыс модели гипогонадизма.** Патологически измененные нейроны: Г-гипохромный, Т-клетки-«тени». Другие обозначения: А-астроциты, О-олигодендроциты.

Малоизмененные (нормохромные) нейроны не обозначены.

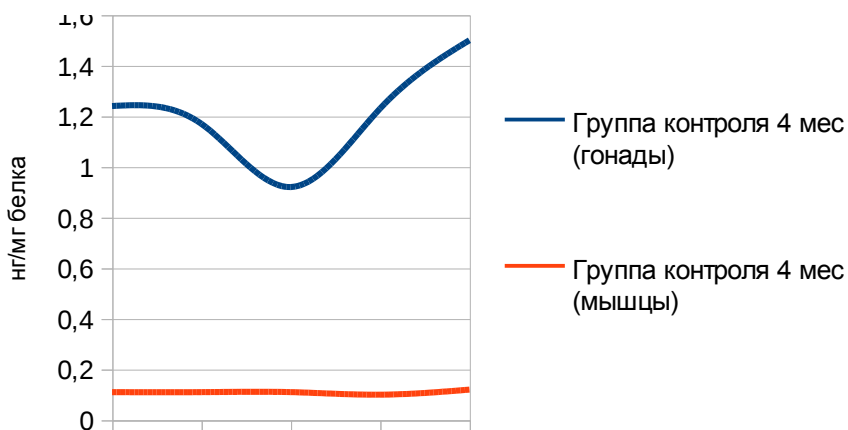
**Нейроны аркуатного медиального ядра у гипогонадных половозрелых крыс на фоне терапии тестостероном.**

## **Выводы:**

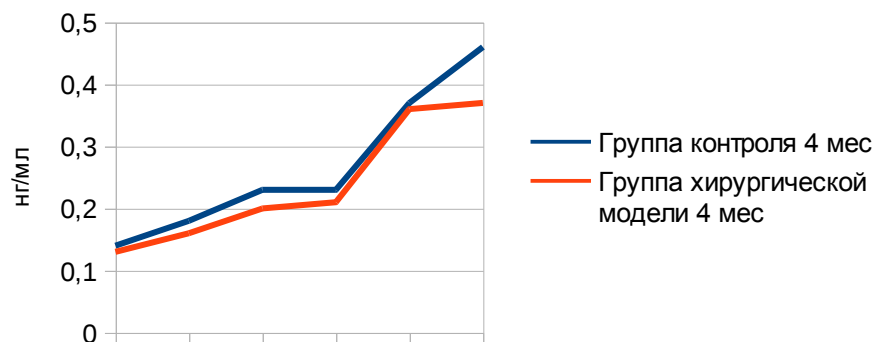
- 1. В экспериментальной модели гипогонадизма в медиальном аркуатном ядре крыс пубертатного возраста отмечались морфологические изменения (дегенеративные и компенсаторно-приспособительные). Первые выражались сокращением доли и уменьшением площади малоизмененных нейронов, сморщиванием, гиперхромией, гипохромией, ростом удельного количества тeneвидных нейронов. Вторые были представлены признаками активации глио-нейрональных и межнейрональных взаимоотношений, многие из которых подвергались компенсационной коррекции в периоде половой зрелости терапией тестостероном. Многие реактивные изменения клеток подвержены компенсационной коррекции в периоде половой зрелости.**
- 2. Терапия тестостероном значительно не изменила глиоцито-нейрональный индекс, который у животных обеих экспериментальных групп оказался значительно выше, чем у контрольных животных.**

# Физиологические особенности периферического киспептинового сигналинга

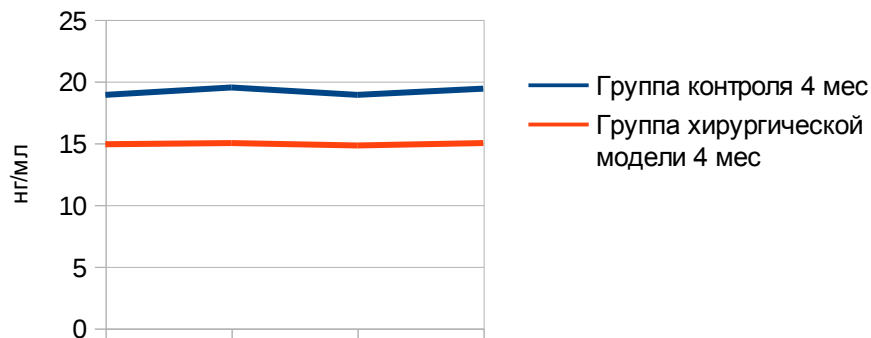
Плотность рецепторов к киспептинам KISS1R в гонадах и мышцах у здоровых половозрелых крыс ( $p < 0,01$ )



Уровень киспептина KISS1 в плазме крови у здоровых половозрелых крыс и в модели гипогонадотропного гипогонадизма ( $p > 0,05$ )



Уровень тестостерона в плазме крови у здоровых половозрелых крыс и в модели гипогонадизма ( $p < 0,01$ )

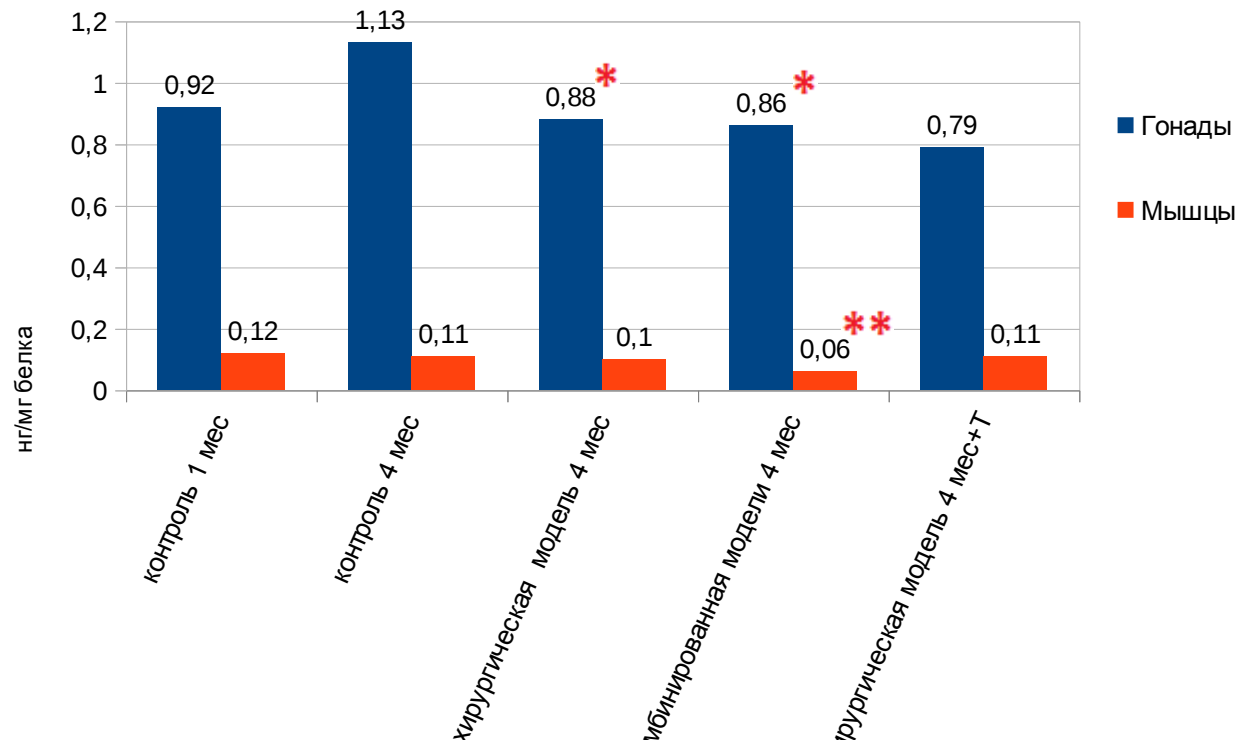


## **Выводы**

**1. При физиологическом варианте полового развития установлена различная плотность кисспептиновых рецепторов в стероидзависимых тканях: наиболее высокая в ткани гонад и существенно более низкая в мышечной ткани.**

**2. Концентрация белка кисспептина в крови самцов крыс является стабильно низкой, независимо от уровня андрогенизации и не отражая, таким образом, степени полового развития как при нормальном, так и при патологическом его течении.**

# Изменения плотности кисспептиновых рецепторов при гипогонадизме



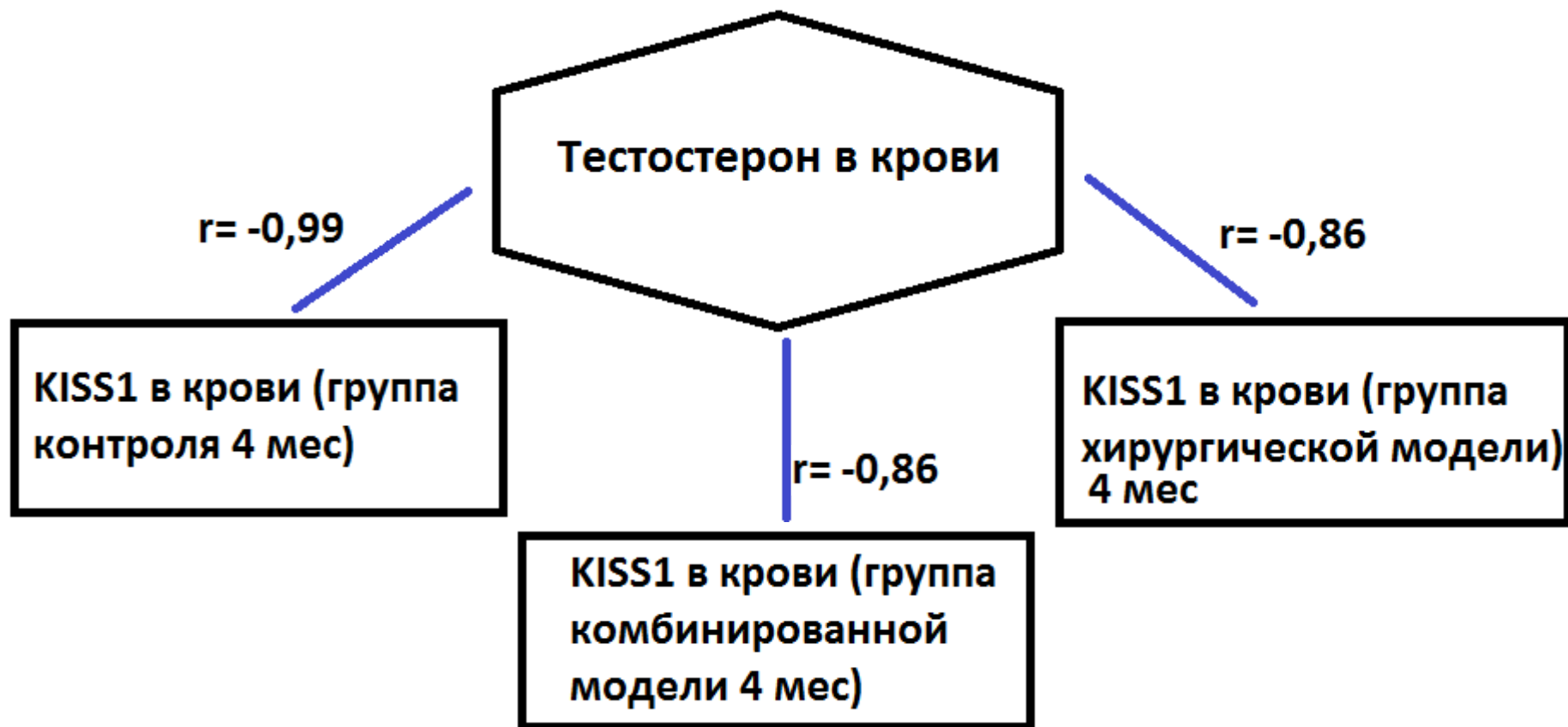
\* достоверность различий плотности KISS1R в гонадах по сравнению с группой контроля 4 мес ( $p < 0,05$ )

\*\* достоверность различий плотности KISS1R в мышцах по сравнению с группой контроля 4 мес ( $p < 0,01$ )

## **Выводы**

**Гипогонадизм, не оказывая существенного влияния на концентрацию кисспептина в крови, приводит к снижению плотности рецепторов кисспептина в периферических стероидзависимых тканях (гонадах и скелетных мышцах), достигающей допубертатного уровня, причем на уровне мышечной ткани данный эффект носит дозозависимый характер и реализуется только при тяжелой степени дефицита андрогенов.**

**Влияние тестостерона на изменение KISS1 в крови  
(корреляционный анализ)**



— прямая корреляция  
— обратная корреляция

## **Вывод**

***Уровень тестостерона в физиологических условиях оказывает разнонаправленное влияние на систему кинспептина в различных биологических средах: в крови при повышении тестостерона отмечается снижение белка кинспептина, в то время, как на уровне андрогензависимых тканей (гонады) повышение уровня тестостерона сопровождается увеличением плотности кинспептиновых рецепторов.***

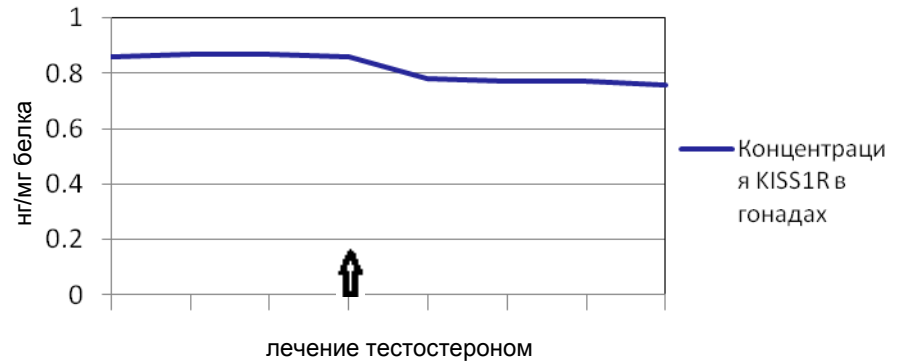
# Влияние терапии тестостероном на изменения системы KISS1-KISS1R

(терапия тестостерона пропионатом по схеме 5 мг/кг/сут 7 дней в возрасте 4 мес)

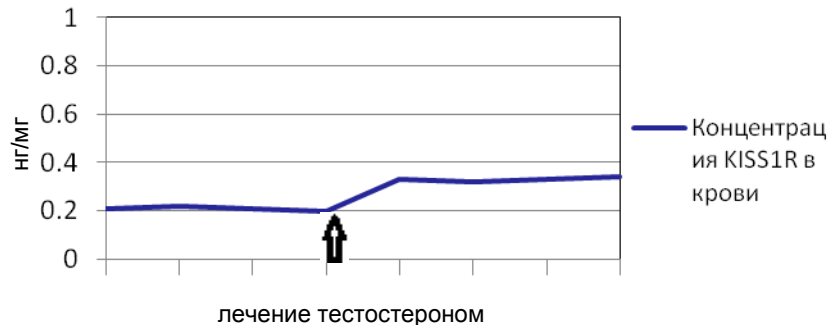
**Динамика концентрации тестостерона в крови на фоне терапии тестостероном ( $p < 0,01$ )**



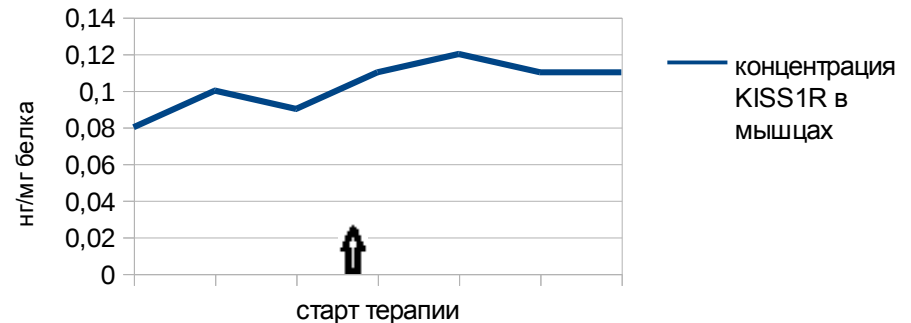
**Динамика концентрации KISS1R в гонадах на фоне терапии тестостероном ( $p > 0,05$ )**



**Динамика концентрации KISS1R в крови на фоне терапии тестостероном ( $p > 0,05$ )**



**Динамика концентрации KISS1R в мышцах на фоне терапии тестостероном ( $p > 0,05$ )**

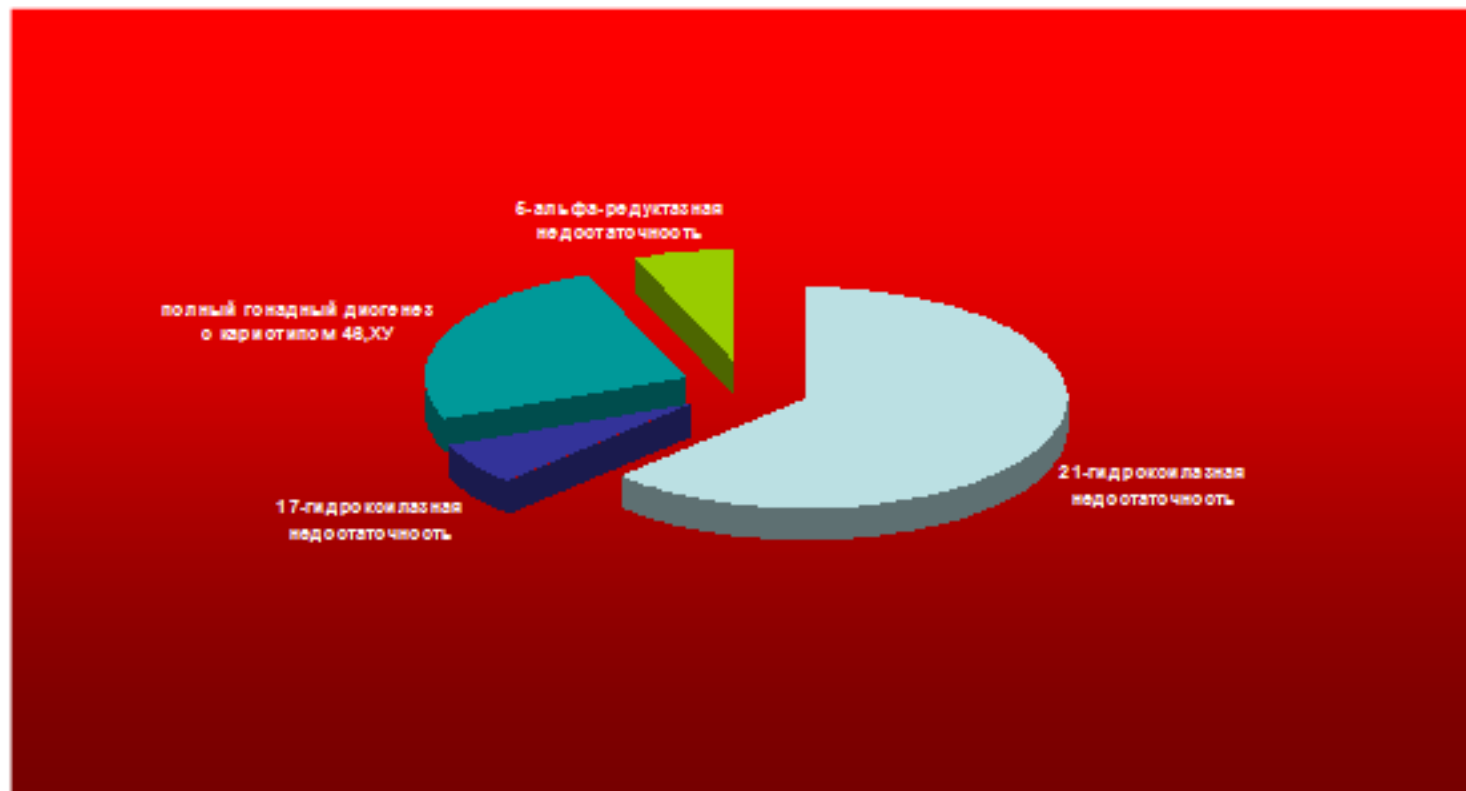


# **Выводы**

- 1. Терапия тестостероном, восстанавливая его уровень в крови, не приводит к значимому изменению плотности кисспептиновых рецепторов в гонадах и мышцах, по крайней мере в использованных дозе и схеме введения. Для уточнения терапевтических возможностей терапии тестостероном требуются дальнейшие исследования.***
- 2. Транслируя результаты экспериментального исследования на клиническую практику, следует отметить, что, несмотря на очевидные изменения кисспептинового сигналинга при гипогонадотропном гипогонадизме на уровне стероидзависимых тканей, определение уровня кисспептина в плазме крови в качестве диагностического маркера представляется малоинформативным ввиду несущественных различий в физиологических условиях на разных стадиях полового развития. Что касается эффективности используемой в настоящее время для терапии гипогонадизма заместительной терапии половыми стероидами, то отсутствие влияния высокой концентрации тестостерона в крови на количество и плотность кисспептиновых рецепторов в стероидзависимых тканях предиктирует целесообразность поиска новых терапевтических возможностей, к которым может относиться, в том числе, применение аналогов кисспептина.***

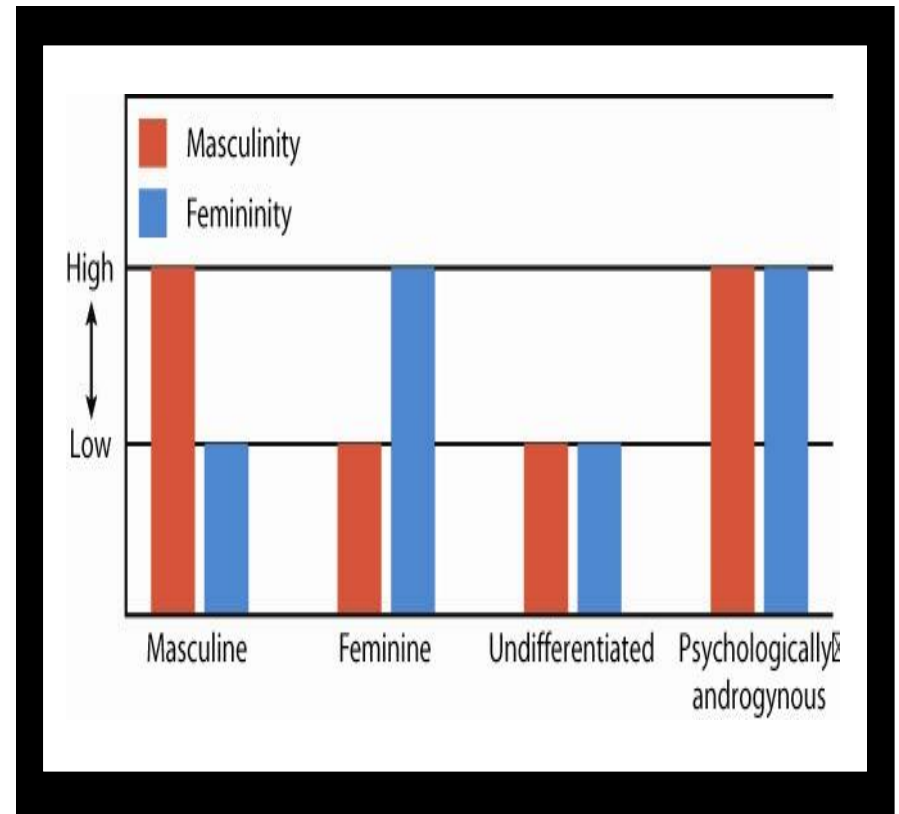
## ***В клинической части исследования***

### Структура диагнозов

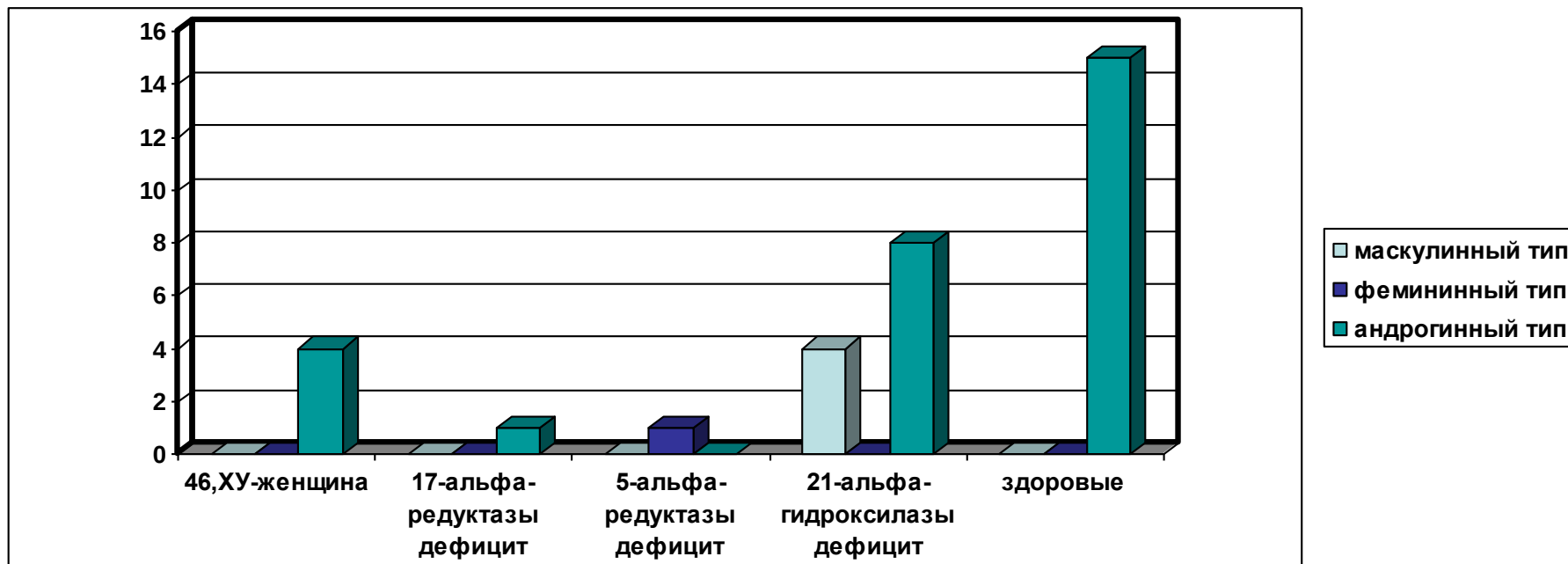


# Ключ к тесту

- Показатели фемининности (F) и маскулинности (M) :
  - $F = \text{сумма баллов по фемининности} / 20$
  - $M = \text{сумма баллов по маскулинности} / 20$
  - Основной индекс  $IS = (F - M) * 2,322$
- 
- маскулинный** - высокие показатели маскулинности и низкие – фемининности
  - фемининный** – высокие показатели фемининности и низкие – маскулинности
  - андрогинный** – высокие показатели как маскулинности, так и фемининности
  - недифференцированный** – низкие показатели и маскулинности, и фемининности



# Результаты тестирования



# Выводы

Большинство пациентов с НФП с ВГКН и 46,XY полным гонадным дисгенезом имели андрогинный психотип, что сопоставимо с контрольной группой детей, не имеющих признаков НФП

Несоответствие генетического и психологического пола констатировано у трети пациентов с ВГКН (21-альфа-гидроксилазная недостаточность), гендерный психотип которых был маскулинным

100% пациентов с 5-альфа-редуктазной недостаточностью имели психотип, характеризующийся выраженной фемининностью

# Выводы

- *Выявленные ранее особенности гендерного психологического пола вполне коррелировали с личностными характеристиками, которые были различны при разных вариантах НФП*
- *При полном гонадном дисгенезе с кариотипом 46,ХУ имели место личностные черты с высокой тревожностью и впечатлительностью*
- *При ВГКН отмечались эмоциональная зрелость, хороший самоконтроль с акцентом у лиц с 21-гидроксилазной недостаточностью на высокий уровень аналитического мышления*
- *5-альфа-редуктазная недостаточность характеризовалась высоким творческим потенциалом на фоне высокой тревожности.*

## **Выводы**

***Установленные варианты психотипа и полоролевого фенотипа у лиц с различными вариантами НФП рекомендуется учитывать при решении вопросов присвоения гражданского пола при верификации психологического пола в комплексной программе оказания помощи при данной группе патологии.***

# Опубликованные статьи:

1. Никитина ИЛ, Байрамов А.А., Ходулева Ю.Н., Шабанов П.Д. Роль кисспептинов в физиологии и патологии полового развития — новые диагностические и терапевтические возможности // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. - 2014. - Т.12.№3. - С.31-39.

2. Дробленков А.В., Ходулева Ю.Н., Асауленко З.П., Байрамов А.А., Никитина И.Л. Дегенеративные изменения нейронов медиального аркуатного гипоталамического ядра в модели мужского гипогонадизма // Педиатр.- 2015.Т.6.№3. - С.62-68.

3. Никитина И.Л. Молекулярно-генетические, нейроэндокринные и психологические основы функциональной организации и регуляции репродуктивной системы и полового развития детей и подростков // в кн. Трансляционная медицина под редакцией акад. Шляхто Е.В. 2-е издание. 2015: 322-340.

4. Кудряшова Е.К., Масель А.С., Нагорная И.И., Никитина И.Л. Роль генетических, гормональных и внешнесредовых факторов в процессах половой дифференцировки мозга//Артериальная гипертензия. -2015. - Т.21,№1. - С.40-47.



## ***Статьи, принятые в печать :***

**1. Дробленков А.В., Ходулева Ю.Н., Асауленко З.П. , Байрамов А.А., Никитина И.Л. «Дегенеративные изменения нейронов медиального аркуатного гипоталамического ядра в модели мужского гипогонадизма». Журнал «Морфология», №2 ,2016**

**2.Никитина И.Л., Ходулева Ю.Н., Масель А.С., Байрамов А.А., Шабанов П.Д. Система KISS-KISS1R: периферический сигналинг в андрогензависимых тканях в модели мужского гипогонадизма. Журнал «Патологическая физиология и экспериментальная терапия», 2016**

## ***Доклад на ESPE, 2016:***

***Nikitina I.L., Khoduleva Yu. N., Nagornaya I.I., Bairamov A.A., Shabanov P.D. Towards the roles of Kisspeptins in the Control of Gonadotropic axis: Focus on Peripheral Signaling in Androgen-dependent Tissues in the Experimentally Induced Model Hypogonadotropic Hypogonadism in Male Rats***

# Выступление с докладами:

1. Никитина И.Л. «Функциональная организация и регуляция репродуктивной системы как важный фактор психосоматического здоровья детей и подростков — известное и новое». Научная сессия «От трансляционных исследований — к инновациям», посвященная 35-летию ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А.Алмазова» МЗ РФ, 28-30 октября 2015г.

2. Ходулева Ю.Н., Никитина И.Л., Байрамов А.А. «Роль пептидных регуляторов гонадной оси в экспериментальной модели гипогонадотропного гипогонадизма». Общероссийская конференция с международным участием «Перинатальная медицина: от прегравидарной подготовки к здоровому материнству и детству», 9-11 декабря 2015г.

3. Ходулева Ю.Н., Никитина И.Л., Байрамов А.А. «Роль пептидных регуляторов гонадной оси в экспериментальной модели гипогонадотропного гипогонадизма» Конференция молодых ученых ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» 23 апреля 2015г.

4. Кудряшова Е.К., Софронова М.Г., Останина Е. А., Никитина И.Л. «Психологический портрет пациентов с различными формами нарушения формирования пола». Общероссийская конференция с международным участием «Перинатальная медицина: от прегравидарной подготовки к здоровому материнству и детству», 9-11 декабря 2015г.

5. Кудряшова Е.К., Масель А.С., Нагорная И.И., Никитина И.Л. «Психологический портрет лиц с нарушением формирования пола». Общероссийская конференция с международным участием «Перинатальная медицина: от прегравидарной подготовки к здоровому материнству и детству» 9-11 декабря 2015 г.

6. Никитина И.Л. «Теоретические и практические аспекты половой дифференцировки мозга». Четвертый германо-российский семинар по эндокринологии и диабетологии», 24-25 апреля 2015 г.

**Научный комитет:**  
Проф. Г.-Ю. Каабе, Германия,  
Проф. Н.В. Воробейко, Россия  
**Организационный комитет:**  
Н.В. Иванова, С.А. Фетт  
**Контактная информация:**  
Тел. +7 921 969 14 21  
Факс +7 812 555 08 70  
e-mail: batic-forum@gmail.com  
web: www.bjse.pro

**Условия участия:**  
Участие в семинаре – бесплатное  
Семинар аккредитован в качестве непрерывного медицинского образования  
Предусмотрен синхронный перевод и публикация сборника тезисов докладов  
**Место проведения:**  
Отель Россия  
Бизнес-центр «Буржуа», зал «Петровский», 2 этаж  
Санкт-Петербург, ул. Чернышевского д.11  
Вход со стороны ул. Варшавской  
Ст. метро Парк Победы (далее от метро 7 минут пешком)

**Генеральные партнеры**  
SANOFI AstraZeneca  
**Партнеры**  
MSD Lilly

ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» МЗ РФ  
Фрунз. ин. Р. Кожа и И.И. Мечникова  
НКО «Ассоциация по изучению нейроиммунноэндокринологии»

**«Четвертый германо-российский семинар по эндокринологии и диабетологии» совместно с «Конференцией молодых ученых Германии и России»**

24-25 апреля 2015 года  
Санкт-Петербург  
Отель «Россия»  
Зал «Петровский»  
bjse.pro

24 апреля 2015

25 апреля 2015

|       |                                                                                                 |                             |       |                                                                                 |                           |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| 09:00 | Приветственное слово                                                                            | проф. Г.-Ю. Каабе, Германия | 09:00 | Приветствие и программа семинара                                                | проф. З. Машади, Германия |
| 09:15 | Клиническая манифестация, диагностика и дифференциальная диагностика диабетической дислипидемии | проф. К. Райберт, Германия  | 09:30 | Возрастные эндокринологические и возрастные дислипидемии                        | проф. Г. Барр, Германия   |
| 09:45 | Снижение фертильности у мужчин: от клинических случаев к клиническим исследованиям              | проф. С. Шлетт, Германия    | 10:00 | Путь тестостерона и механизмы дислипидемии при хронической тяжелой дислипидемии | проф. С. Ворпел, Германия |
| 10:15 | Теоретические и практические аспекты половой дифференцировки мозга                              | проф. И.Л. Никитина, Россия | 10:30 | Новый взгляд на синдром Клайнфельтера                                           | проф. С. Ворпел, Германия |
| 10:45 | Дислипидемия                                                                                    |                             | 11:00 | Уменьшение у мужчин: Причины и механизмы                                        | проф. С. Ворпел, Германия |
| 11:00 | Клинические аспекты дислипидемии                                                                | проф. Е. Ясбайт, Германия   | 11:30 | Дислипидемия, дислипидемия, дислипидемия: клинические аспекты                   | проф. М. Янко, Германия   |
| 11:15 | Эндокринные аспекты дислипидемии                                                                | А.Ю. Байрамов, Россия       | 11:45 | Максимальная дислипидемия: клинические аспекты                                  | проф. М. Янко, Германия   |
| 11:45 | Максимальная дислипидемия: клинические аспекты                                                  |                             | 12:00 | Максимальная дислипидемия: клинические аспекты                                  | проф. М. Янко, Германия   |
| 12:15 | Секция методов лечения                                                                          |                             | 12:15 | Максимальная дислипидемия: клинические аспекты                                  | проф. М. Янко, Германия   |
| 12:30 | Дислипидемия                                                                                    |                             | 12:30 | Максимальная дислипидемия: клинические аспекты                                  | проф. М. Янко, Германия   |
| 13:00 | Снижение фертильности у мужчин: от клинических случаев к клиническим исследованиям              | проф. Д. Зеттлер, Германия  | 13:00 | Максимальная дислипидемия: клинические аспекты                                  | проф. М. Янко, Германия   |
| 13:15 | Влияние дислипидемии на фертильность                                                            | с Н.А. Чарникова, Россия    | 13:30 | Максимальная дислипидемия: клинические аспекты                                  | проф. М. Янко, Германия   |
| 13:45 | Влияние дислипидемии на фертильность                                                            | с Н.А. Чарникова, Россия    | 13:45 | Максимальная дислипидемия: клинические аспекты                                  | проф. М. Янко, Германия   |
| 14:00 | Влияние дислипидемии на фертильность                                                            | с Н.А. Чарникова, Россия    | 14:15 | Максимальная дислипидемия: клинические аспекты                                  | проф. М. Янко, Германия   |
| 14:15 | Влияние дислипидемии на фертильность                                                            | с Н.А. Чарникова, Россия    | 14:30 | Максимальная дислипидемия: клинические аспекты                                  | проф. М. Янко, Германия   |
| 14:45 | Влияние дислипидемии на фертильность                                                            | с Н.А. Чарникова, Россия    | 14:55 | Максимальная дислипидемия: клинические аспекты                                  | проф. М. Янко, Германия   |
| 15:00 | Влияние дислипидемии на фертильность                                                            | с Н.А. Чарникова, Россия    | 15:15 | Максимальная дислипидемия: клинические аспекты                                  | проф. М. Янко, Германия   |
| 15:30 | Влияние дислипидемии на фертильность                                                            | с Н.А. Чарникова, Россия    | 15:45 | Максимальная дислипидемия: клинические аспекты                                  | проф. М. Янко, Германия   |
| 15:45 | Влияние дислипидемии на фертильность                                                            | с Н.А. Чарникова, Россия    | 16:00 | Максимальная дислипидемия: клинические аспекты                                  | проф. М. Янко, Германия   |
| 16:00 | Влияние дислипидемии на фертильность                                                            | с Н.А. Чарникова, Россия    | 16:15 | Максимальная дислипидемия: клинические аспекты                                  | проф. М. Янко, Германия   |
| 16:30 | Влияние дислипидемии на фертильность                                                            | с Н.А. Чарникова, Россия    | 16:45 | Максимальная дислипидемия: клинические аспекты                                  | проф. М. Янко, Германия   |
| 16:45 | Влияние дислипидемии на фертильность                                                            | с Н.А. Чарникова, Россия    | 17:00 | Максимальная дислипидемия: клинические аспекты                                  | проф. М. Янко, Германия   |
| 17:00 | Влияние дислипидемии на фертильность                                                            | с Н.А. Чарникова, Россия    | 17:15 | Максимальная дислипидемия: клинические аспекты                                  | проф. М. Янко, Германия   |

## ***Тезисы:***

1.Ходулева Ю.Н., Дробленков А.В., Никитина И.Л., Байрамов А.А., Шабанов П.Д. Дегенеративные изменения нейронов медиального аркуатного гипоталамического ядра при гипогонадотропном гипогонадизме // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2015, Т.13, с.182.

2.Кудряшова Е.К., Масель А.С., Нагорная И.И., Никитина И.Л. Психологический портрет лиц с нарушением формирования пола//Трансляционная медицина, приложение №2, апрель2015 год ISSN: 2410-5155 Online ISSN: 2311-4495

# Финансирование программы в 2015 г.

| п/п № | Наименование закупаемого товара (на русском языке)<br>например (набор реагентов: название реагентов с указанием<br>точной расфасовки, концентрация, в мл, см, и т.д.) | К какому<br>аппарату | Кат №                                            | кол-во | ед изм<br>(набор,<br>упак и<br>т. д.) | Производит<br>ель, страна                                                                  | цена   | стоимость<br>(руб) |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|--------------------------------------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------------------|
| 1     | Моноклональные антитела к рецептору Андрогенов крыс<br>(Androgen Receptor (AR) Antibody)                                                                              |                      | MAB252Ra21                                       | 1      | 0,2-0,5<br>мл                         | MyBioSource,<br>Inc. USA<br>Cloud-Clone<br>Corp. USA<br>Usen Life<br>Science Inc.<br>Китай | 38753  | 38 753             |
| 2     | Набор Rat Kisspeptin 1 (KISS1) ELISA Kit 96 стрипов, набор<br>для определения KISS1 в сыворотке крови крыс                                                            |                      | MBS2515650<br>MBS073437<br>или<br>CEC559Ra       | 1      | уп 96<br>тестов                       | MyBioSource, Inc. USA<br><br>Cloud-Clone<br>Corp. USA                                      | 100500 | 100 500            |
| 3     | Поливалентные наборы для визуализации антител на<br>основе биотина (заказать любой из них):<br>Название: Polyvalent HRP Plus Kit                                      |                      | UVX - 060<br>UVX - 125<br>HRP - 060<br>HRP — 125 |        |                                       |                                                                                            |        |                    |
| 4     | Хромоген для визуализации комплекса антиген-антитела<br>(первичные и вторичные)                                                                                       |                      | DAB - 060<br>DAB — 125                           |        |                                       |                                                                                            |        |                    |
| 5     | Моноклональные антитела к рецептору кисспептина крыс<br>(Rat Kisspeptin Receptor (KISS1R))                                                                            |                      | MAF540Ra21                                       | 1      | 0,2-0,5<br>мл                         | Cloud-Clone<br>Corp. USA                                                                   | 39754  | 39 754             |

**ВСЕГО:**

**200 000**

Подпись