

АНАЛИЗ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ КОНЬЮГАТА РЕКОМБИНАНТНОГО ГИСТОНА H1.3 С ФОТОАКТИВИРУЕМЫМ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ КРАСИТЕЛЕМ

М.Н. Шапошников¹, Д.О. Соловьева^{1,3}, С.Ю. Зайцев¹, В.В. Соловьева², И.И. Салафутдинов², А.А. Ризванов²

¹ Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, Москва, Россия

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

³ Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, Россия

Intracellular localization analysis of a conjugate of recombinant histone H1.3 with photoactivated fluorescent dye

M.N. Shaposhnikov¹, D.O. Solovyeva^{1,3}, S.Yu. Zaitsev¹, V.V. Solovyeva², I.I. Salafutdinov², A.A. Rizvanov²

¹ K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Bionanotechnology, Moscow, Russia

² Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

³ National Research Nuclear University «MEPhI», Moscow, Russia

Гистонные белки являются перспективными носителями для доставки рекомбинантных нуклеиновых кислот в различные культуры клеток. Получение конъюгатов таких белков с флуоресцентными красителями является современным инструментом в исследовании клеточного транспорта и внутриклеточного распределения важных биополимеров. Целью данной работы являлась оптимизация методики конъюгации рекомбинантного гистона H1.3 и фотоактивируемого флуоресцентного красителя, исследование проникновения полученного конъюгата в клетки и определение его внутриклеточной локализации. В ходе работы оптимизирована методика получения конъюгата, способного интенсивно флуоресцировать в красной области спектра, после облучения фиолетовым светом. Определена степень конъюгации при разных условиях. Проведено сравнение цитотоксичности гистона H1.3 и его конъюгата с фотоактивируемым флуоресцентным красителем (ФФК) в культуре клеток HeLa, а также его внутриклеточная локализация. Обнаружено, что конъюгаты в значительной степени концентрируются в рециркулирующих эндосомах, в меньшей степени – в пероксисомах.

Таким образом, полученный конъюгат рекомбинантного гистона H1.3 с ФФК может быть в дальнейшем использован для исследований его противоопухолевого действия и как носителя для доставки лекарственных препаратов и нуклеиновых кислот в клетки человека и животных.

Ключевые слова: рекомбинантный гистон H1.3, конъюгация, внутриклеточная визуализация, флуоресцентные красители, фотоактивация.

По литературным данным, гистонные белки могут служить эффективными векторами для переноса рекомбинантных нуклеиновых кислот в клетки. Известно, что положительный заряд гистонных белков способствует их проникновению через отрицательно заряженную клеточную мембрану. Рекомбинантный гистон H1.3 в составе препарата «Онкогист» является перспективным для лечения острого миелоидного лейкоза и в настоящее время проходит клинические исследования в России [1]. Помимо противоопухолевого действия, благодаря своим катионным свойствам, рекомбинантный гистон H1.3 можно использовать в качестве носителя для повышения эффективности генетической модификации клеток рекомбинантными лентивирусами [2]. В этой связи необходимо исследовать молекулярный механизм проникновения и транспорта рекомбинантного гистона H1.3 в клетках человека, для чего активно используются флуоресцентные красители [3–8].

Histone proteins are promising carriers for delivery of recombinant nucleic acids in various cell cultures. Conjugates of proteins with fluorescent dyes are modern tools in the study of cellular transport and intracellular distribution of important biopolymers. The aim of this work was to optimize the method of recombinant histone H1.3 conjugation with photoactivatable fluorescent dye. Also we studied intracellular penetration and subcellular localization of the resulting conjugate. Resulting conjugate was capable of intensive fluorescence in the red region of the spectrum after irradiation with violet light. The degree of conjugation was determined under different reaction conditions. A comparison of the cytotoxicity of histone H1.3 and its conjugate with photoactivated fluorescent dye in HeLa cells and its intracellular localization was characterized. We found that conjugates mainly localize in recycling endosomes and to a lesser extent in peroxisomes.

Thus, the resulting conjugate of recombinant histone H1.3 with photoactivatable fluorescent dye can be used for further studies its anticancer activity and as carrier for drugs and nucleic acids delivery into human and animal cells.

Key words: recombinant histone H1.3, conjugation, intracellular imaging, fluorescent dyes, photoactivation.

Фотоактивируемые флуоресцентные красители (ФФК) изначально существуют в нефлуоресцентной форме, которая может быть преобразована во флуоресцентную форму путем облучения светом с длиной волны света 405 нм [3–5]. Поэтому ФФК представляют огромный интерес для микроскопии биологических объектов и могут быть использованы для отслеживания белков [6, 7], создания многоцветных приложений [8], во флуоресцентной наноскопии. Это особенно важно и перспективно для применения в схемах визуализации с высокими разрешающими параметрами (PALM, F-PALM, STORM) [9–11]. В последнее время разработана схема с участием ФФК, который имеет в структуре молекулы реакционно-способную сукцинимидильную группу (ФФК-NHS). Эта группа способна формировать ковалентные связи с первичными аминогруппами [3, 5] (остатки лизина) гистона H1.3 с образованием конъюгата ФФК-H1.3. Полученный флуорес-

центно меченый конъюгат может применяться для внутриклеточной визуализации рекомбинантного гистона H1 с помощью флуоресцентной микроскопии. ФФК имеет в своей структуре светочувствительную diazoкетонную группу, которая при облучении фиолетовым лазером конфокального микроскопа подвергается деструкции с образованием нетоксичного флуоресцентного продукта [12–15]. Данная способность к фотоактивации красителя позволит исследовать динамику распределения (транспорта) гистона H1.3 в нативных клетках после локальной активации комплекса ФФК с гистоном.

Целью работы являлась оптимизация методики получения конъюгата гистона H1.3 с фотоактивируемым флуоресцентным красителем (ФФК-H1.3), исследование проникновения рекомбинантного гистона H1.3 и его локализации с помощью ФФК-H1.3 в культуре клеток *in vitro*.

Материал и методы

Получение конъюгата рекомбинантного гистона H1.3 с ФФК

Рекомбинантный гистон H1.3 предоставлен ОАО «Институт стволовых клеток человека» (Россия). Для получения конъюгата гистона H1.3 с фотоактивируемым флуоресцентным красителем (ФФК-H1.3) использовали ФФК-NHS (N-сукцинимидиловый эфир ФФК), предоставленный В.Н. Беловым (синтезирован в Макс-Планк-Институте биофизической химии, Гёттинген, Германия) [3].

ФФК является производным тетраметилпродами-на, способным интенсивно флуоресцировать в красной области спектра, после облучения фиолетовым светом, вследствие образования флуоресцентного продукта «Род» [4]. Строение ФФК-NHS и конъюгата ФФК-H1.3 представлены на рисунке 1.

Краситель ФФК-NHS в количестве 0,5 мг растворяли в 50 мкл ДМСО и добавляли к 200 мкл раствора бикарбонатного буфера (0,05 М), содержащего 2 мг гистона H1.3 (количество ФФК-NHS с 10-кратным избытком). Реакционную массу выдерживали при комнатной температуре в течение 1,5 ч. По завершении реакции конъюгации реакционную массу нейтрализовали 0,1 н уксусной кислотой и доводили объем реакционной массы дисцитилирован-

ной водой до 500 мкл. Очищали полученный раствор конъюгата с использованием колонки (Centri Sep) центрифугированием, с предварительно гидролизованым гелем Sephadex G-25 (для белков молекулярной массой >10 кДа), для удаления несвязавшегося красителя ФФК-NHS, гидроксисукцинимид и буферных ионов. Полученный раствор конъюгата флуоресцировал после УФ облучения, с длиной волны максимума флуоресценции 583 нм.

Электрофоретическое исследование

Образцы гистона H1.3 и конъюгата ФФК-H1.3 наносили в лунки 12% полиакриламидного геля и проводили гель электрофорез белков в денатурирующих условиях в полиакриламидном геле по Лэммли. Результаты электрофореза анализировали с использованием биомолекулярного имиджера Typhoon Fly 9500 (GE Healthcare, Германия) и системы для визуализации гелей Image Quant Las 4000 (GE Healthcare, Германия).

Спектральные исследования конъюгата ФФК-H1.3

Для вычисления концентрации конъюгата ФФК-H1.3 в растворе после отчистки использовали метод количественного определения белка в растворе по Брэдфорду. Интенсивность поглощения растворов измеряли на многофункциональном микропланшетном ридере Infinite M200Pro (Tecan, США). Калибровочная кривая была построена по неочищенному конъюгату ФФК-H1.3, поскольку в нем содержится меньше аминокрупп, чем в исходном рекомбинантном гистоне H1.3.

Культивирование клеток

Используемую в работе культуру клеток карциномы шейки матки HeLa (номер ATCC: CCL-2) культивировали при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Для культивирования использовали среду Игла, модифицированную по методу Дульбекко (DMEM) (Панэко, Россия), к которой были добавлены 10% сыворотки крови плодов коровы (FBS) (Sigma, США), 2 мМ L-глутамин (Панэко, Россия) и 1:1 смесь антибиотиков пенициллина и стрептомицина (Панэко, Россия).

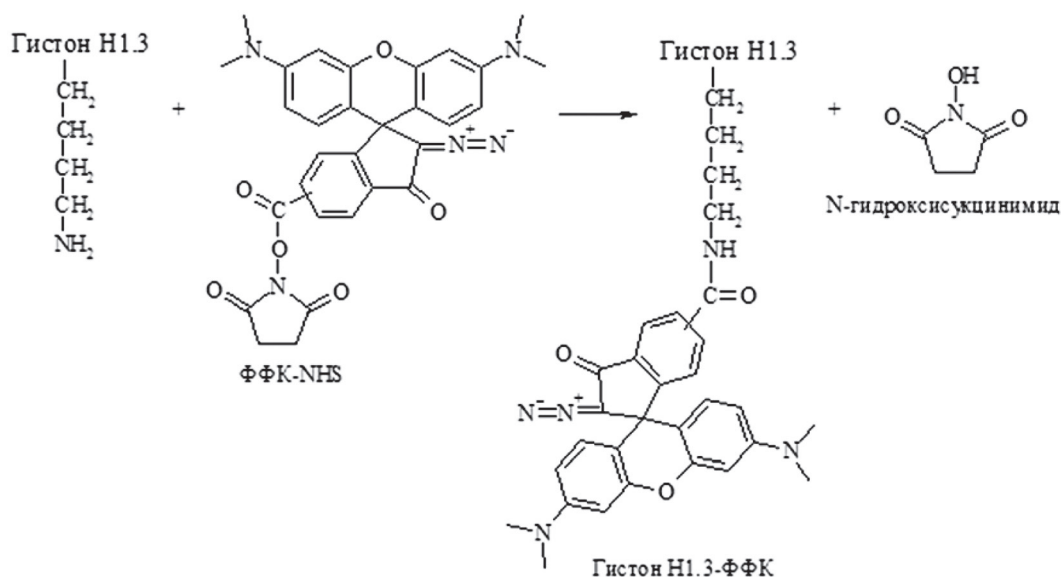


Рис. 1. Схема синтеза конъюгата ФФК-H1.3 из рекомбинантного гистона H1.3 и ФФК-NHS

Определение цитотоксичности конъюгата ФФК-Н1.3 в культуре клеток HeLa

Растворы рекомбинантного гистона Н1.3 и конъюгата ФФК-Н1.3 разводили в 100 мкл культуральной среде до конечных концентраций 50, 250 и 1000 мкг/мл, после чего меняли культуральную среду клеток HeLa на 100 мкл приготовленной смеси, содержащей гистон Н1.3 или ФФК-Н1.3.

Цитотоксичность гистона Н1.3 и конъюгата ФФК-Н1.3 определяли с помощью реагента CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, США) (MTS-тест) на многофункциональном микропланшетном ридере Infinite M200Pro (Tecan) через 24 ч инкубации в двухволновом режиме: основной фильтр – 490 нм, референс-фильтр – 630 нм. Эксперимент проводили в 4-х повторностях ($n = 4$). Статистический анализ проводили с помощью t-критерия Стьюдента в программе Microsoft Excel.

Анализ внутриклеточной локализации конъюгата ФФК-Н1.3

Внутриклеточную локализацию конъюгата ФФК-Н1.3 исследовали на культуре клеток карциномы шейки матки HeLa путем трансфекции с использованием плазмид, экспрессирующих циановый вариант зеленого флуоресцентного белка Turquoise в виде химерного (фьюжен) белка с клеточными белками, локализующихся в пероксисомах [16], и зеленого флуоресцентного белка GFP в виде химерного белка с доминантно-негативной (англ. Dominant negative, DN) мутантной формой низкомолекулярного GTP-связывающего белка Rab11. Применение мутантной формы белка Rab11 позволит нарушить процесс эндоцитоза на стадии перинуклеарных рециркулирующих эндосом [17]. Плазмиды GFP-rab11 DN (plasmid ID 126778) и pmTurquoise2-Peroxi (plasmid ID 36203) были получены из некоммерческой организации AddGene (www.addgene.org).

Для подготовки образцов клетки HeLa диссоциировали с использованием 0,25% раствора трипсина-ЭДТА (Sigma-Aldrich, США) и наносили на стерильные покровные стекла. Клетки использовали по достижению ими полуконфлюэнтного монослоя. Трансфекцию клеток проводили с использованием трансфекционного агента TurboFect (Thermo Fisher Scientific Inc., США) согласно методике, рекомендуемой производителем.

Через 24 ч после трансфекции конъюгат ФФК-Н1.3 (в концентрации 30 мкг/мл) добавляли в лунки культурального планшета с предварительно выращенными на покровных стеклах клетками HeLa и инкубировали в течение 1 ч.

Локализацию конъюгата ФФК-Н1.3 определяли с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 на базе моторизованного инвертированного микроскопа Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения Manual LSM 780, ZEN 2011 на базе междисциплинарного центра аналитической микроскопии Казанского федерального университета. Для этого после двух отмывок культуральной средой покровные стекла вынимали из лунок планшета, помещали на предметное стекло клетками между стекол и немедленно микроскопировали.

Результаты и обсуждение

Электрофоретическое исследование конъюгата ФФК-Н1.3

После электрофореза в полиакриламидном геле образцов гистона Н1.3 и конъюгата ФФК-Н1.3 провели фотоактивацию геля УФ облучением при 280 нм. При этом проявилась интенсивная флуоресценция конъюгата ФФК-Н1.3, которую возбуждали лазером 532 нм. Показано, что полоса образца конъюгата ФФК-Н1.3 при окрашивании геля коллоидным Кумасси G250 оказалась заметно выше уровня полосы нативного белка – гистона Н1.3 (рис. 2). Эта разница связана с увеличением молекулярной массы гистона за счет конъюгации с ФФК. Рекомбинантный гистон и его конъюгат мигрировали медленнее в электрическом поле при гель-электрофорезе и показали большую молекулярную массу, чем ожидаемая 22,5 кДа для исходного белка. Это связано с выраженным положительным зарядом гистонов, что снижает их электрофоретическую подвижность.

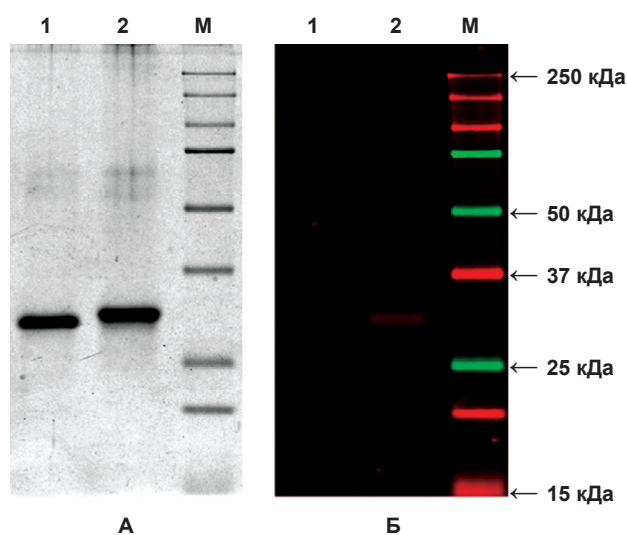


Рис. 2. Гель-электрофорез исходного и конъюгированного рекомбинантного гистона Н1.3 с ФФК-NHS:

1 – исходный рекомбинантный гистон Н1.3;

2 – конъюгат ФФК-Н1.3;

М – флуоресцентно меченый белковый маркер (161-0376, BioRad, США).

А – окрашивание геля коллоидным Кумасси;

Б – флуоресценция конъюгата ФФК-Н1.3 после фотоактивации при возбуждении лазером 532 нм

Спектральные исследования конъюгата ФФК-Н1.3

Значение интенсивности поглощения анализируемого раствора конъюгата ФФК-Н1.3 после очистки составило 0,8464, которое по калибровочной кривой соответствует 2,95 мкг рекомбинантного гистона Н1.3. Таким образом, концентрация очищенного раствора конъюгата ФФК-Н1.3 составила 2,95 мг/мл. С помощью спектрофотометра USB4000-FL (Ocean Optics, США) были получены спектры поглощения растворов флуоресцентной формы ФФК и конъюгатов после их фотоактивации ртутной лампой (100 Вт) в 1 мл пластиковой кювете в течение 5 мин (рис. 3).

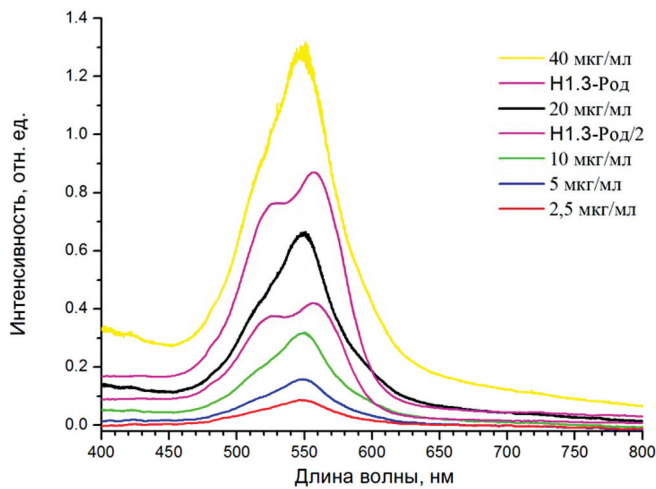


Рис. 3. Спектры поглощения растворов флуоресцентной формы ФФК (Род) и растворов конъюгата после фотоактивации (Н1.3-Род) и его разведение дисцитилированной водой в 2 раза (Н1.3-Род/2)

Для определения степени конъюгации была построена калибровочная кривая значений максимумов интенсивности поглощения растворов ФФК разной концентрации (5, 10, 20, 40 мкг/мл) после фотоактивации. Измерив 40 и 20 мкл конъюгата ФФК-Н1.3 получили максимумы поглощения – 0,87 и 0,42, которым соответствуют 27 и 13 мкг ФФК. Таким образом, в 1 мл конъюгата было в среднем 663 ± 12 мкг конъюгированного красителя. Если в 1 мл 2,95 мг конъюгированного гистона и 0,663 мг ФФК, то значит молярное отношение гистон Н1.3 к ФФК составляет 1:8,8 и полученный конъюгат можно использовать для дальнейших биомедицинских исследований.

Определение цитотоксичности конъюгата ФФК-Н1.3

Ранее нами было показано, что рекомбинантный гистон Н1.3 обладает низкой цитотоксичностью в широком диапазоне концентраций [2]. В настоящей работе нами была определена цитотоксичность конъюгата ФФК-Н1.3 в культуре клеток HeLa. Для исследования были использованы концентрации ФФК-Н1.3 50, 250 и 1000 мкг/мл. Было показано, что после 24 ч инкубации клеток HeLa с конъюгатом ФФК-Н1.3 в концентрации 1000 мкг/мл наблюдалось снижение жизнеспособности по сравнению с клетками без добавления ФФК-Н1.3 (контроль). ФФК-Н1.3 в концентрациях 50 и 250 мкг/мл оказывал стимулирующее действие на жизнеспособность клеток HeLa, которая была статистически значимо выше по сравнению с контрольными клетками. Анализ цитотоксических показателей рекомбинантного гистона Н1.3 и ФФК-Н1.3 показал, что конъюгация гистона Н1.3 с ФФК не влияет на цитотоксичность гистонного белка (рис. 4).

Анализ внутриклеточной локализации конъюгата ФФК-Н1.3

Для подтверждения проникновения конъюгата ФФК-Н1.3 в клетки и анализа его внутриклеточной локализации была использована культура клеток

HeLa, трансфицированная плазмидами, экспрессирующими циановый вариант GFP – Turquoise в виде химерного белка с клеточными белками, локализуемых в пероксисомах, или GFP в виде химерного белка с доминантно-негативной мутантной формой белка Rab11, локализуемых в рециркулирующих эндосомах.

Из микрофотографий, изображенных на рис. 5 можно сделать вывод, что полученный конъюгат гистона Н1.3 с ФФК способен проникать внутрь клеток и эффективно связывается с внутриклеточными органеллами.

Было показано, что после инкубации с клетками HeLa в течение 1 ч конъюгаты ФФК-Н1.3 преимущественно концентрируются в рециркулирующих эндосомах клеток (рис. 6), а также в меньшей степени – пероксисомах (рис. 5). Также были проведены исследования, которые показали, что конъюгаты ФФК-Н1.3 не включаются в митохондрии, эндоплазматический ретикулум, комплекс Гольджи клеток HeLa (данные не приведены из-за малой информативности).

Таким образом, полученный конъюгат рекомбинантного гистона Н1.3 с ФФК может быть в дальнейшем использован для исследований его противоопухолевого действия и как носителя для доставки лекарственных препаратов и нуклеиновых кислот в клетки человека и животных.

Заключение

В настоящей работе исследовано проникновение и внутриклеточная локализация рекомбинантного гистона Н1.3 с помощью фотоактивируемого флуоресцентного красителя в культуре клеток *in vitro*. Полученный конъюгат ФФК-Н1.3 не проявляет выраженной цитотоксичности по сравнению с немодифицированным белком и является пригодным для биомедицинских исследований. Анализ внутриклеточной локализации ФФК-Н1.3 показал, что ФФК-Н1.3 способен проникать в клетки и локализоваться преимущественно в рециркулирующих эндосомах.

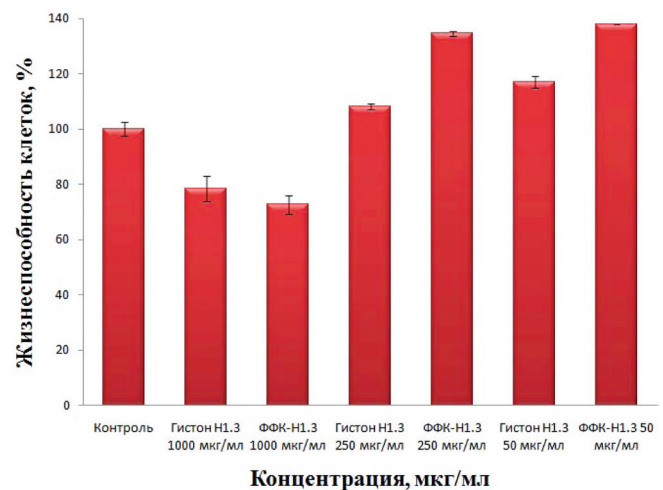


Рис. 4. Количество жизнеспособных клеток HeLa через 24 ч инкубации с рекомбинантным гистонами Н1.3 и конъюгатом ФФК-Н1.3 в различных концентрациях. Количество жизнеспособных клеток в контроле (интактная культура) принята за 100%. MTS-тест

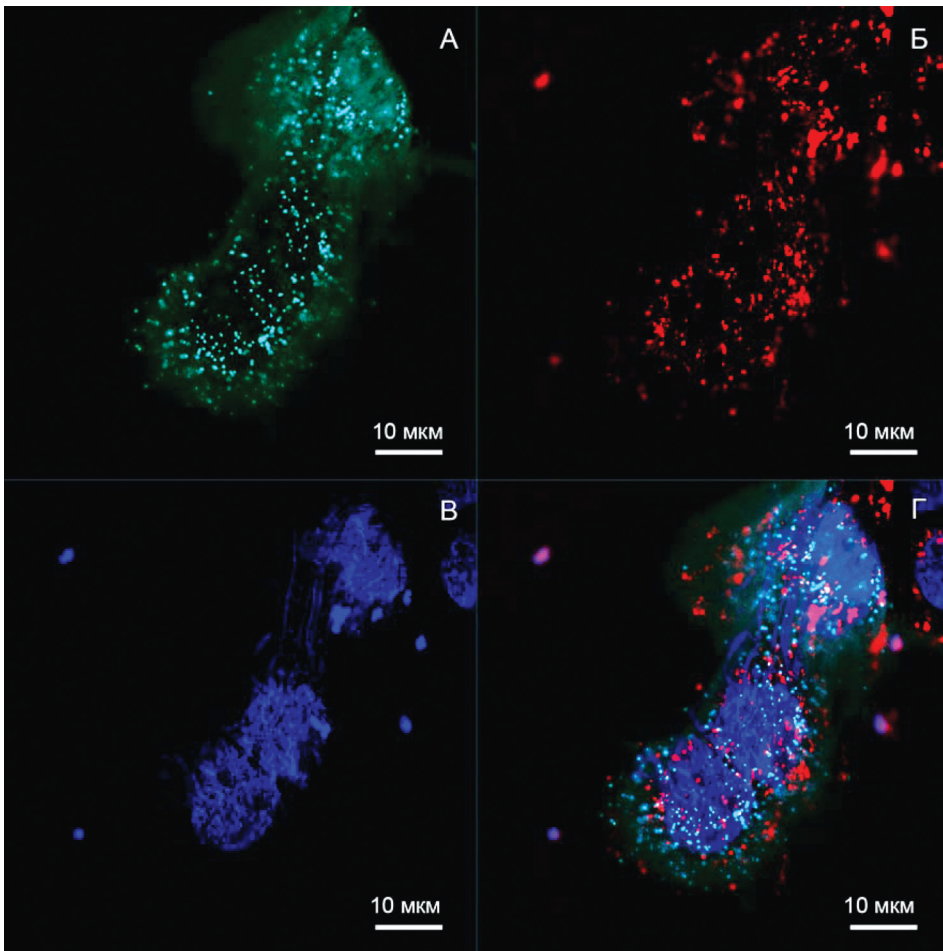


Рис. 5.
Клетки HeLa, трансфицированные плазмидой с *pmTurquoise2-Peroxi*, через 24 ч после добавления конъюгата ФФК-Н1.3: А – экспрессия белка *Turquoise* с клеточными белками, локализующимися в пероксисомах; Б – флуоресценция конъюгата ФФК-Н1.3; В – окраска ядра *Hoechst*; Г – совмещенное изображение. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

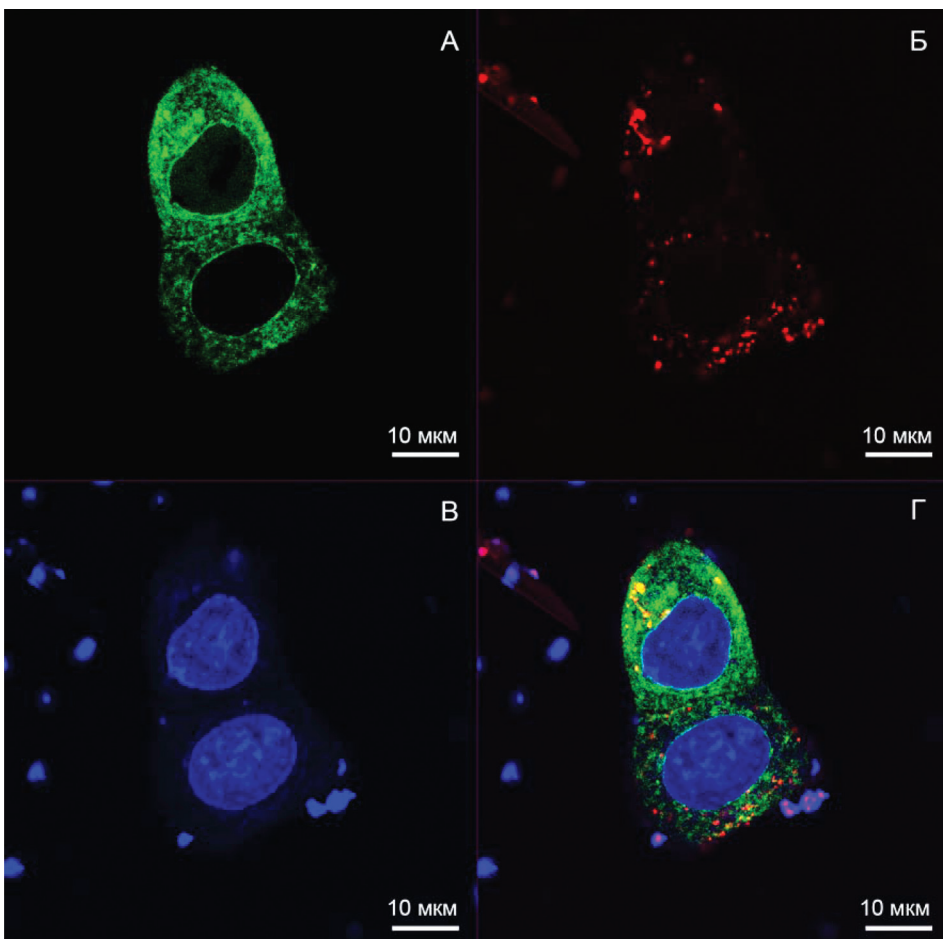


Рис. 6.
Клетки HeLa, трансфицированные плазмидой с *GFP-rab11 DN*, через 24 ч после добавления конъюгата ФФК-Н1.3: А – экспрессия белка *GFP* с доминантно-негативной мутантной формой белка *Rab11*, локализующегося в рециркулирующих эндосомах; Б – флуоресценция конъюгата ФФК-Н1.3; В – окраска ядра *Hoechst*; Г – совмещенное изображение. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

Благодарности

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Работа

финансировалась грантом РФФИ 13-04-97099. Рекомбинантный гистон H1.3 предоставлен ОАО «Институт стволовых клеток человека». Работа частично выполнена на оборудовании междисциплинарного центра аналитической микроскопии (директор Осин Ю.Н., оператор Кузнецова С.В.) и Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Соловьева В.В., Кудряшова Н.В., Ризванов А.А. Перенос рекомбинантных нуклеиновых кислот в клетки (трансфекция) с помощью гистонов и других ядерных белков. Клеточная Трансплантология и Тканевая Инженерия 2011; 6(3): 29-40.
2. Соловьева В.В., Исаев А.А., Генкин Д.Д. и др. Влияние рекомбинантного гистона H1.3 на эффективность лентивирусной трансдукции клеток человека *in vitro*. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2012; 7(3): 151-4.
3. Belov V.N., Wurm C.A., Boyarskiy V.P. et al. Rhodamines NN: a novel class of caged fluorescent dyes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2010; 49(20): 3520-3.
4. Зайцев С.Ю., Шапошников М.Н., Свиричевская Е.В. Окрашивание клеток новыми фотоактивируемыми флуоресцентными красителями. Ветеринарная медицина 2010; 3: 32-4.
5. Шапошников М.Н., Чудаков Д.Б., Генералов А.А. и др. Получение конъюгата хитозана с фотоактивируемым флуоресцентным красителем и его применение в клеточной микроскопии. Ветеринарная медицина. 2012; 3-4: 32-5.
6. Lidke D.S., Wilson B.S. Caught in the act: quantifying protein behaviour in living cells. *Trends Cell Biol.* 2009; 19(11): 566-74.
7. Lippincott-Schwartz J., Snapp E., Kenworthy A. Studying protein dynamics in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001; 2(6): 444-56.
8. Neher R.A., Mitkovski M., Kirchhoff F. et al. Blind source separation techniques for the decomposition of multiply labeled fluorescence images. *Biophys. J.* 2009; 96(9): 3791-800.
9. Betzig E., Patterson G.H., Sougrat R. et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 2006; 313(5793): 1642-5.
10. Hess S.T., Girirajan T.P., Mason M.D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys. J.* 2006; 91(11): 4258-72.
11. Rust M.J., Bates M., Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods.* 2006; 3(10): 793-5.
12. Шапошников М.Н., Зайцев С.Ю., Чудаков Д.Б. и др. Определение локализации нового фотоактивируемого флуоресцентного красителя в культуре клеток A431 с помощью селективных флуоресцентных зондов. Учен. За. Казан. Гос. Акад. Вет. Мед. им. Н.Э. Баумана. 2013; 214: 483-8.
13. Шапошников М.Н., Чудаков Д.Б., Генералов А.А. и др. Зависимость флуоресценции нового фотоактивируемого красителя от параметров среды. Фундаментальные исследования 2012; 9(2): 322-7.
14. Zaitsev S.Y., Shaposhnikov M.N., Solovyeva D.O. et al. Novel precursors of fluorescent dyes. 1. Interaction of the dyes with model phospholipid in monolayers. *Cell Biochem. Biophys.* 2013; 67(3): 1365-70.
15. Zaitsev S.Y., Shaposhnikov M.N., Solovyeva D.O. et al. Cell Staining by Novel Derivatives of Fluorescent Rhodamine Dyes. *World Appl. Sci. J.* 2013; 26(6): 712-8.
16. Goedhart J., von Stetten D., Noirclerc-Savoye M. et al. Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nat. Commun.* 2012; 3: 751.
17. Choudhury A., Dominguez M., Puri V. et al. Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells. *J. Clin. Invest.* 2002; 109(12): 1541-50.

Поступила: 05.07.2014