

Обратимость выхода петель ДНК при «кометном» электрофорезе изолированных клеток

К. С. Афанасьева, Т. А. Шувалова, М. О. Зажицкая, А. В. Сиволоб

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко
Ул. Владимирская, 64, Киев, 01033, Украина

sivolob@univ.kiev.ua

Исследована кинетика выхода ДНК при кометном электрофорезе изолированных лимфоцитов человека. Электрофорез проводили при нейтральных рН в отсутствие или в присутствии различных концентраций бромистого этидия. Продемонстрированная зависимость эффективности выхода ДНК от концентрации бромистого этидия свидетельствует о том, что хвост кометы представляет собой растянутые в электрическом поле петлевые домены. При условии релаксации петель выход ДНК существенно облегчается, а при наличии в вытянутой петле определенного уровня торсионных напряжений наблюдается исчезновение «комет» после выключения электрического поля. Обсуждаются возможности использования обнаруженных эффектов для усовершенствования методики кометного электрофореза.

Ключевые слова: кометный электрофорез, петлевые домены, бромистый этидий, торсионные напряжения ДНК.

Введение. Кометный электрофорез – удобный и весьма популярный метод оценки уровня повреждений ДНК в отдельных клетках [1–3]. Суть его заключается в том, что изолированные клетки заправляют в агарозу на поверхности предметного стекла (готовят так называемые слайды), лизируют для удаления мембран и связанных с ДНК белков (при сохранении в большинстве случаев связи с ядерным матриксом), после чего полученные таким образом нуклеоиды [4] подвергают электрофорезу. Под действием электрического поля ДНК выходит из лизированной клетки, формируя электрофоретический трек – зону, напоминающую хвост кометы. При этом наличие повреждений в ДНК (возникших в результате апоптоза, действия ионизирующей радиации, свободных радикалов и

т. п.) существенно облегчает образование такого хвоста, что и лежит в основе широкого использования метода.

Существенная методическая проблема заключается в значительной вариабельности результатов, полученных в разных лабораториях. Это привело к ряду попыток стандартизации условий эксперимента [1–3, 5], хотя ясно, что абсолютная стандартизация условий электрофореза невозможна в принципе: на разных электрофоретических аппаратах приходится эмпирически подбирать время электрофореза (обычно от 20 до 60 мин [1–3, 5, 6]), что затрудняет сравнение получаемых результатов.

Кроме того, несмотря на популярность кометного электрофореза, до сих пор нет единого мнения о природе ДНК, формирующей хвост кометы [3]. С одной стороны, представляется очевидным, что накопление одноцепочечных разрывов (ников) должно приводить к появлению разрывов двухцепо-

К. С. АФАНАСЬЕВА, Т. А. ШУВАЛОВА, М. О. ЗАЖИЦКАЯ,
А. В. СИВОЛОБ, 2008

чечных, и тогда хвост кометы – это линейные фрагменты ДНК, либо сохранившие (одним своим концом) связь с ядерным матриксом, либо утратившие ее. С другой стороны, поскольку увеличение числа ников сопровождается возрастанием доли ДНК в хвосте при сохранении его длины, высказано предположение о том, что причиной облегчения выхода ДНК является релаксация закрепленных на ядерном матриксе сверхспирализованных петлевых доменов ДНК [7]. Действительно, сверхспирализация, возникающая в нуклеоиде вследствие удаления нуклеосом в процессе лизиса [4], способствует компактизации петель. При наличии хотя бы одного ника на петлю сверхспирализация исчезает, и петли должны легче преодолевать сопротивление агарозы при электрофорезе.

В этой статье представлены доказательства релаксации петлевых доменов как главного механизма выхода ДНК при кометном электрофорезе. Следует отметить, что хотя первоначально кометный электрофорез осуществляли при нейтральных рН, в последнее время чаще используют так называемый щелочной кометный электрофорез – при высоких значениях рН после инкубации слайдов в растворе щелочи с рН >13 [1–3]. Поскольку щелочная среда способствует разрывам ДНК в сайтах апуринизации, ДНК после такой обработки заведомо не является интактной. Так как наша цель заключалась в изучении механизмов формирования хвоста кометы, мы проводили кометный электрофорез при нейтральных рН.

На изолированных лимфоцитах человека мы исследовали кинетику образования комет и влияние на эту кинетику топологического состояния петель ДНК. Последнее изменяли при помощи интеркалирующего красителя бромистого этидия (БЭ), способного раскручивать двойную спираль. Продемонстрированная нами зависимость эффективности образования кометных хвостов от концентрации БЭ убедительно свидетельствует в пользу того, что хвост кометы представляет собой растянутые в электрическом поле петлевые домены. Кроме того, высокий уровень торсионных напряжений в растянутой петле обеспечивает обратимость образования хвоста: при выключении электрического поля наблюдается исчезновение комет.

Полученные нами результаты позволяют также предложить усовершенствование методики кометного электрофореза за счет регистрации кинетики выхода (или возврата) ДНК вместо использования фиксированного времени электрофореза.

Материалы и методы. Использовали лимфоциты периферической крови человека. Кровь брали из пальца добровольных доноров (несколько здоровых мужчин среднего возраста) в шприц, содержащий гепарин. Сразу после забора крови выделяли лимфоциты, используя соответствующий тест-набор (раствор Хенкса, градиент плотности фиколл-верографина, «Реакомплекс», РФ), следуя рекомендациям изготовителя. Лимфоциты, полученные центрифугированием крови в градиенте плотности, дважды промывали 0,15 М раствором NaCl. Сразу после промывания 50 мкл полученной суспензии лимфоцитов смешивали со 100 мкл 1 %-й легкоплавкой агарозы («Sigma», США) при температуре ~50 °С, 25 мкл смеси наносили на предметное стекло, покрытое слоем 1 % тугоплавкой агарозы.

Полученные слайды выдерживали в течение 3–5 мин при $t = 4\text{ °C}$ для полимеризации агарозы и погружали в охлажденный до 4 °С лизирующий буфер: 2,5 М NaCl, 100 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl, рН 8,0, 1 % тритон X-100 («Ferak», ФРГ), который добавляли непосредственно перед использованием буфера. Лизис проводили при $t = 4\text{ °C}$ на протяжении не менее 1 ч. Далее стекла погружали на 10–15 мин в буфер TBE (89 мМ трис, 89 мМ H_3BO_3 , 2 мМ ЭДТА, рН 7,5).

Затем несколько предметных стекол со слайдами помещали в электрофоретический аппарат, электрофорез проводили в буфере TBE (4 °С) при напряженности 1 В/см и силе тока 300 мА. В электрофоретическом буфере присутствовал БЭ в концентрациях 0, $5 \cdot 10^{-5}$, $2 \cdot 10^{-4}$ или $3,5 \cdot 10^{-4}$ мг/мл. Концентрацию бромистого этидия в маточном растворе регистрировали спектрофотометрически. Для измерения кинетики образования комет стекла извлекали из аппарата через разные промежутки времени для последующего анализа.

При изучении обратимости образования комет проводили электрофорез для нескольких стекол в течение длительного времени (не менее 1 ч), затем

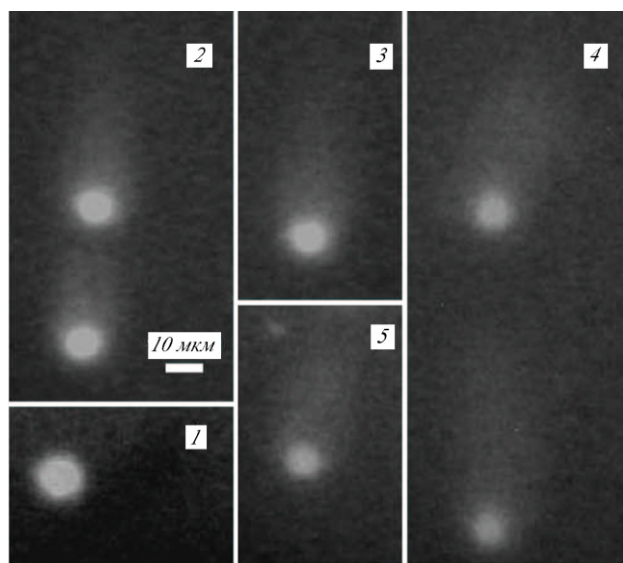


Рис. 1. Типичные изображения клеток после кометного электрофореза, полученные при помощи флуоресцентного микроскопа. Представлены примеры клеток без (1) и с кометными хвостами (2–5)

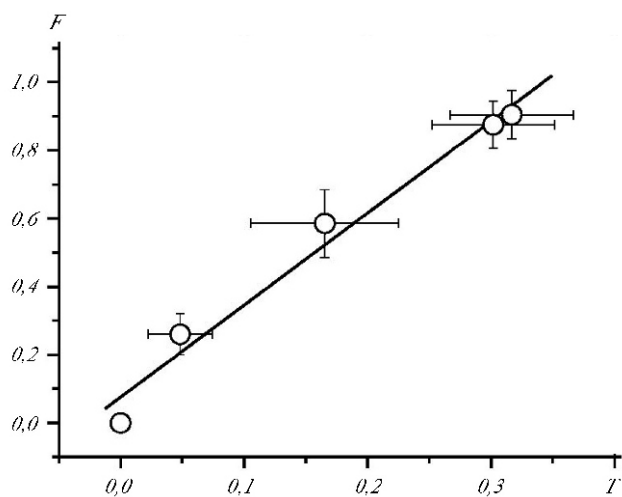


Рис. 2. Корреляция между долей клеток, образующих кометы (F), и средней долей ДНК в хвостах комет (T). Представлены результаты одного из экспериментов, проведенных в присутствии $5 \cdot 10^{-5}$ мг/мл бромистого этидия

выключали ток, инкубировали стекла в электрофоретическом буфере при $t = 4^\circ\text{C}$ и извлекали их для анализа через разные промежутки времени.

В ряде экспериментов выделенные лимфоциты перед приготовлением слайдов подвергали рентгеновскому облучению в дозе 0,25 Гр на установке РУМ-17 («Мосрентген», РФ). Электрофорез облученных лимфоцитов проводили в отсутствие БЭ.

Слайды, окрашенные в растворе 5 мкг/мл БЭ, просматривали при помощи флуоресцентного микроскопа Люмам РЗ («ЛОМО», РФ) и фотографировали цифровым фотоаппаратом. Долю клеток с хвостами (далее – доля комет) определяли среди 100–200 клеток. В ряде опытов изображения клеток сканировали при помощи программного пакета Scion Image («Scion Corporation», США), определяя относительное содержание ДНК в хвосте и ядре кометы.

Результаты и обсуждение. Несколько примеров того, как выглядят лизированные клетки после электрофореза под флуоресцентным микроскопом, представлено на рис. 1. Приведенные изображения являются типичными: мы не наблюдали вариаций внешнего вида комет во всех наших экспериментах. Средняя длина хвоста может быть равна примерно 50 мкм (соответствующее отношение длины хвоста к диаметру ядра составляет $\sim 5,5$), доля ДНК в хвосте (от общего количества в хвосте и ядре кометы) варьирует в зависимости от времени электрофореза от 0 до 35 %.

Возрастание среднего содержания ДНК в хвостах комет в течение электрофореза происходит параллельно с увеличением доли комет. Как показано на рис. 2, наблюдается практически линейная корреляция между этими двумя параметрами. Таким образом, долю комет можно рассматривать как величину, пропорциональную эффективности выхода ДНК в хвост кометы.

Данные по кинетике возрастания доли комет за время электрофореза представлены на рис. 3, а. В отсутствие БЭ доля комет сохраняется на низком уровне до 30 мин электрофореза, после чего начинает возрастать и достигает практически 100 % через 120 мин. Рентгеновское облучение клеток приводит к тому, что доля комет выходит на высокий уровень уже через 15 мин. Это позволяет заключить, что ДНК необлученных лимфоцитов является в основном интактной, и только при достаточно длительном времени электрофореза внешняя электрическая сила заставляет ДНК сформировать хвост кометы.

Если ДНК интактна, то хвост такой кометы не может содержать ничего, кроме петель, закрепленных своими концами на ядерном матриксе. Выходя

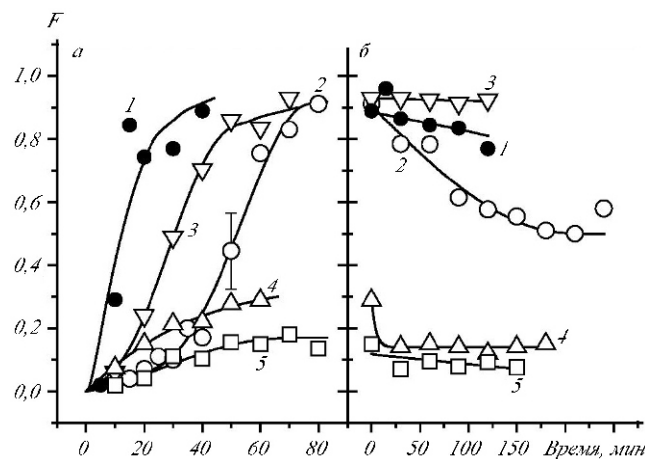


Рис. 3. Зависимость доли клеток, образовавших кометы, от времени электрофореза (а) и времени инкубации в электрофоретическом буфере после выключения длительного электрофореза (б) для облученных (1) и необлученных клеток в отсутствие (2) и в присутствии $5 \cdot 10^{-5}$ (3), $2 \cdot 10^{-4}$ (4) и $3,5 \cdot 10^{-4}$ (5) мг/мл бромистого этидия. Каждая точка отражает среднее значение для 3–5 независимых экспериментов. Приведенная погрешность (стандартное отклонение), указанная только для одной точки для облегчения восприятия рисунка, является максимальной. Сплошные кривые – результат интерполяции

из клетки, помимо сопротивления агарозы такие петли должны преодолевать свое собственное упругое сопротивление. После удаления хроматиновых белков при лизисе в ядерной ДНК остается отрицательная сверхспирализация, плотность которой σ_0 должна составлять величину примерно $-0,05$ (из расчета – 1 супервиток на нуклеосому [8] при плотности нуклеосом $1/200$ п. н. и спиральной периодичности ДНК $10,5$ п. н. на виток двойной спирали). Вытягивание петли ДНК автоматически создает торсионное напряжение отрицательного знака (в сторону раскручивания двойной спирали). Соответственно можно ожидать, что снятие такого напряжения облегчает выход комет.

Простейшим способом снять отрицательное напряжение в ДНК является локальное раскручивание двойной спирали за счет интеркаляции БЭ [9]. Действительно, в присутствии $5 \cdot 10^{-5}$ мг/мл красителя наблюдается существенное ускорение выхода комет (рис. 3, а). Отметим, что из всех использованных нами концентраций БЭ (данные на рис. 3 представлены только для части из них) указанная концентрация оказалась наиболее эффективной в плане ускорения выхода комет. Можно заключить, что

эта концентрация примерно соответствует полной релаксации отрицательной сверхспирализации. Увеличение концентрации БЭ (и соответственно плотности его связывания с ДНК) приводит к накоплению торсионных напряжений уже положительного знака, которые снова тормозят выход комет – даже в сравнении с кинетикой выхода ДНК в отсутствие красителя (рис. 3, а). Следует отметить, что наличие описанных эффектов бромистого этидия однозначно свидетельствует об интактности (по преимуществу) ДНК необлученных клеток: только в отсутствие одноцепочечных разрывов ДНК петельного домена характеризуется топологическими ограничениями. Рассмотрим влияние БЭ на топологическое состояние петель ДНК и эффективность их выхода при электрофорезе более подробно. Интеркаляция изменяет начальную, оцененную выше, плотность сверхспирализации σ_0 до величины $\sigma = \sigma_0 + \sigma_E$, где $\sigma_E = h/360^\circ$ [10], где σ – плотность связывания БЭ (число интеркалировавшихся молекул на 1 п. н.); $\sigma_0 = 22^\circ$ [10] – угол раскрутки соседних пар оснований в сайте интеркаляции; $h = 10,5$ п. н. на виток – периодичность двойной спирали. Интеркаляция БЭ с кольцевой ДНК (эквивалентной ДНК петельного домена) описывается уравнением [9]

$$L/K \frac{(1 - \sigma)^n}{(1 - \sigma)^{n-1}} \exp[2A(\sigma_0 - \sigma)],$$

где L – молярная концентрация свободного красителя (в нашем случае равна концентрации БЭ, добавленного в электрофоретический буфер); K – константа связывания; $n = 2,5$ п. н. [10] – размер сайта связывания; $A = 5$ [9, 10] – модифицированная силовая константа сверхспирализации; $\sigma_0 = \sigma_0 / 360^\circ$ (h) – плотность связывания, при которой достигается полная релаксация исходной отрицательной сверхспирализации. То есть при $\sigma = \sigma_0$ экспоненциальный член в уравнении превращается в 1, а само уравнение становится эквивалентным уравнению, описывающему связывание БЭ с линейной (или никотиновой) ДНК. Если принять, что концентрация БЭ $5 \cdot 10^{-5}$ мг/мл соответствует точке релаксации (достигаемая при этом величина $\sigma = \sigma_0$ и суммарная плотность сверхспирализации σ_0), то из уравнения следует оценка константы

связывания $K = 9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, что хорошо согласуется с ожидаемой величиной константы при ионной силе буфера ТВЕ [10]. Используя это значение константы, можно вычислить суммарную плотность сверхспирализации при двух других концентрациях БЭ:

+0,035 при $2 \cdot 10^{-4}$ мг/мл и +0,05 при $3,5 \cdot 10^{-4}$ мг/мл.

Возникает вопрос: почему при практически одинаковых абсолютных значениях уровня торсионных напряжений в отсутствие БЭ и при его концентрации $3,5 \cdot 10^{-4}$ мг/мл в последнем случае наблюдается существенное торможение выхода комет (рис. 3, а)? Вероятно, ответ на этот вопрос заключается в том простом обстоятельстве, что двойная спираль ДНК является правой: в отрицательно сверхспирализованной кольцевой ДНК возможны структурные переходы, направленные на раскручивание дуплекса, простейшим из которых является локальное плавление двойной спирали [11]. Реализация таких переходов снижает эффективный уровень торсионных напряжений. В положительно сверхспирализованной ДНК подобный эффект невозможен, и уровень напряжений оказывается выше по абсолютной величине. Кроме того, энергетика связывания самого БЭ с положительно сверхспирализованной ДНК дополнительно способствует сохранению компактной перекрученной формы петли [10, 12].

Другой вопрос, возникающий при анализе зависимостей на рис. 3, а, связан со сравнением скоростей выхода комет для облученных клеток и необлученных в присутствии $5 \cdot 10^{-5}$ мг/мл БЭ. Если в обоих случаях мы имеем дело с релаксированными петлями (за счет соответственно внесения разрывов и интеркаляции), то почему ДНК облученных клеток выходит существенно быстрее? Можно предположить, что при облучении мы получаем также некоторое количество двухцепочечных разрывов (разрезанных петель) и тогда линейная ДНК испытывает значительно меньшее сопротивление агарозы. Не отвергая этой возможности, следует однако отметить, что использованная нами доза облучения весьма невелика. Для сравнения – при дозе 1 Гр, по некоторым оценкам [13], индуцируется порядка 1000 разрывов на клетку, что много меньше одного разрыва на петлю. Другое объяснение обсуждаемо-

го различия заключается в наличии достаточно широкого распределения петель и/или клеток по величине исходной отрицательной сверхспирализации. В результате никакая концентрация БЭ не способна полностью релаксировать всю ДНК, и внесение разрывов оказывается значительно более эффективным способом релаксации определенной части петель, которые и формируют хвост кометы.

Приведенный выше анализ данных по кинетике кометного электрофореза свидетельствует о том, что наличие торсионных напряжений в петлях ДНК тормозит образование комет: вытягивание петли подобно растягиванию пружины под действием внешней силы. Как известно, исчезновение такой силы приводит к обратному сжатию пружины. Аналогично, прекращение электрофореза должно вызывать сокращение доли ДНК в хвостах комет: петли должны «заскакивать» обратно под действием упругих сил. Ясно, что подобного эффекта не следует ожидать в тех вариантах опытов, в которых не возникают упругие торсионные напряжения: при релаксации петель за счет разрывов или интеркаляции БЭ. В полном соответствии с вышеизложенными мы наблюдали частичное исчезновение комет после прекращения электрофореза (рис. 3, б). Как видно из этого рисунка, доля комет оставалась на практически постоянном максимальном уровне для облученных клеток и для клеток в присутствии $5 \cdot 10^{-5}$ мг/мл БЭ (в точке релаксации). Для клеток в отсутствие БЭ отмечено медленное сокращение доли комет – возможно, «пружина» ДНК, в которой реализованы структурные переходы (см. выше), срабатывает не слишком эффективно. В присутствии $2 \cdot 10^{-4}$ мг/мл БЭ доля комет очень быстро снижается до некоторого невысокого уровня, далее остающегося неизменным. Этот остаточный уровень комет примерно совпадает с долей комет, максимально достигаемой при электрофорезе в присутствии $3,5 \cdot 10^{-4}$ мг/мл БЭ. Соответственно, при этой концентрации красителя доля комет практически не изменяется после прекращения электрофореза (см. а и б на рис. 3).

Необратимость выхода ДНК из облученных клеток и наличие в препаратах необлученных клеток некоторой части комет, не исчезающих после прекращения электрофореза в присутствии высо-

ких концентраций БЭ, позволяет предположить, что эти остающиеся кометы сформированы петлями, содержащими одноцепочечные разрывы (возникшие вследствие физиологических процессов). Видимо, при максимальной из использованных нами концентраций красителя только такие петли и способны выходить из клеток при электрофорезе.

Представленные результаты однозначно указывают на то, что хвост кометы при электрофорезе изолированных лизированных клеток образуется за счет «выпетливания» ДНК, существенно облегчаемого при условии релаксации торсионных напряжений. При этом, что достаточно неожиданно (хотя и очевидно *a posteriori*), такое «выпетливание» оказывается обратимым при наличии определенного уровня торсионных напряжений в вытянутой петле.

С одной стороны, описанный подход открывает возможность оценки топологического состояния ДНК в ядрах различных клеток при различных функциональных состояниях при помощи определения концентрации интеркалятора, наиболее ускоряющей образование комет. С другой стороны, обнаруженные эффекты позволяют предложить ряд усовершенствований методики кометного электрофореза.

Во-первых, представляется очевидным, что исследование кинетики появления комет по сравнению с обычно используемым фиксированным временем электрофореза является гораздо более чувствительным подходом для оценки даже незначительного количества одноцепочечных разрывов в ДНК. К тому же кинетические измерения, снимая сам вопрос о том или ином времени электрофореза, можно рассматривать как один из путей стандартизации метода. Во-вторых, проведение электрофореза в присутствии высоких концентраций интеркаляторов позволит более адекватно оценить именно уровень повреждений ДНК – в формировании комет в этом случае участвуют только петли с разрывами, лишённые топологических ограничений.

Наконец, для оценки уровня повреждений можно использовать совсем простой подход: определять долю комет после инкубации препаратов в электрофоретическом буфере, сменя-

ющей длительный электрофорез в присутствии высокой концентрации интеркалятора.

K. S. Afanasieva, T. A. Shuvalova, M. O. Zazhytska, A. V. Sivolob

Reversibility of DNA loops exit during single cell gel electrophoresis

Summary

The kinetics of DNA exit during single cell gel electrophoresis (comet assay) of human lymphocytes has been investigated. The electrophoresis was performed at neutral pH in the absence/presence of different ethidium bromide concentrations. The dependence demonstrated of DNA exit efficiency on ethidium bromide concentration points out that the comet tail consists of DNA loop domains extended by the electric field. The loop exit is facilitated significantly by relaxed DNA torsional constraint. However, the disappearance of comets was observed after switching off the electric field at the condition of some constraint in the extended loops. Several possibilities of applications of discovered effects to improve the comet assay were discussed.

Key words: comet assay, loop domains, ethidium bromide, DNA torsional constraint.

K. C. Афанасьева, Т. О. Шувалова, М. О. Зажицька, А. В. Сиволоб

Оборотність виходу петель ДНК при кометному електрофорезі ізольованих клітин

Резюме

Досліджено кінетику виходу ДНК при кометному електрофорезі ізольованих лімфоцитів людини. Електрофорез проводили за нейтральних рН у відсутності чи присутності різних концентрацій бромистого етидію. Продемонстрована залежність ефективності виходу ДНК від концентрації останнього свідчить про те, що хвіст комети являє собою розтягнуті в електричному полі петельні домени. За умови релаксації петель вихід ДНК суттєво полегшується, а за збереження певного рівня торсійних напружень у витягнутій петлі спостерігається зникнення комет після вимкнення електричного поля. Обговорюються можливості використання виявлених ефектів для вдосконалення методики кометного електрофорезу.

Ключові слова: кометний електрофорез, петельні домени, бромистий етидій, торсійні напруження в ДНК.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Olive P. L. The comet assay. An overview of techniques // Meth. Mol. Biol.–2002.–**203**.–P. 179–194.
2. Collins A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations // Mol. Biotechnol.–2004.–**26**, N 3.–P. 249–261.
3. Mrller P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures // Basic and Clin. Pharmacol. and Toxicol.–2006.–**98**, N 4.–P. 336–345.
4. Cook P. R., Brazell I. A., Jost E. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA // J. Cell Sci.–1976.–**22**, N 2.–P. 303–324.

5. Hartmann A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V., Tice R. R. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay // *Mutagenesis*.—2003.—**18**, N 1.—P. 45–51.
6. Horvathova E., Dusinska M., Shaposhnikov S., Collins A. DNA damage and repair measured in different genomic regions using the comet assay with fluorescent *in situ* hybridization // *Mutagenesis*.—2004.—**19**, N 4.—P. 269–276.
7. Collins A. R., Dobson V. L., Dusinska M., Kennedy G., Stetina R. The comet assay: what can it really tell us? // *Mutat. Res.*—1997.—**375**, N 2.—P. 183–193.
8. Simpson R. T., Thoma F., Brubaker J. M. Chromatin reconstituted from tandemly repeated cloned DNA fragments and core histones: a model system for study of higher order structure // *Cell*.—1985.—**42**, N 3.—P. 799–808.
9. Bauer W., Vinograd J. Interaction of closed circular DNA with intercalative dyes II. The free energy of superhelix formation in SV40 DNA // *J. Mol. Biol.*—1970.—**47**, N 3.—P. 419–435.
10. Sivolob A., De Lucia F., Revet B., Prunell A. Nucleosome dynamics II. High flexibility of nucleosome entering and exiting DNAs to positive crossing. An ethidium bromide fluorescence study of mononucleosomes on DNA minicircles // *J. Mol. Biol.*—1999.—**285**, N 3.—P. 1081–1099.
11. Benham C. J. Energetics of the strand separation transition in superhelical DNA // *J. Mol. Biol.*—1992.—**225**, N 3.—P. 835–847.
12. Sivolob A., Prunell A. Nucleosome dynamics V. Ethidium bromide versus histone tails in modulating ethidium bromide-driven tetrasome chiral transition. A fluorescence study of tetrasome on DNA minicircles // *J. Mol. Biol.*—2000.—**295**, N 1.—P. 41–53.
13. Mrller P. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in humans blood cell DNA // *Mutat. Res.*—2006.—**612**, N 2.—P. 84–104.

УДК 577.323:576.08
Надійшла до редакції 20.06.07