

Н.М. Матвієнко¹, Л.П. Бучацький¹, О.М. Дерябін²

¹Інститут рибного господарства НААН, 03164, вул. Обухівська, 135, Київ,
e-mail: mna@nae73@mail.ru

²Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів,
03151, вул. Донецька, 30, Київ

ЗАСТОСУВАННЯ ЗВОРОТНО-ТРАНСКРИПТАЗНОЇ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО ПАНКРЕАТИЧНОГО НЕКРОЗУ РАЙДУЖНОЇ ФОРЕЛІ (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

Мета роботи: розробити діагностичну тест систему для виявлення та ідентифікації інфекційного панкреатичного некрозу форелі на основі зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР). **Матеріали та методи:** Віруси: вірус інфекційного некрозу підшлункової залози штам референтний – Ab (8,0 lg ТЦД50 /см³); українські ізоляти – VF-11 (6,8 lg ТЦД50 /см³), VF-08 (6,2 lg ТЦД50 /см³), вірус геморагічної симтецимії форелі (VHSV), штам «DH4r101» [AY546581] (8,0 lg ТЦД50 /см³). Перещеплювальні лінії клітин риб: FHM (хвостове стебло чорного толстоголова) і RTG (гонади райдужної форелі). Для виявлення та ідентифікації вірусу інфекційного панкреатичного некрозу форелі були використані дві пари олігонуклеотидних праймерів. Для пошуку та аналізу гомології генів білків VP2 і NS вірусу інфекційного панкреатичного некрозу використовували програму BLAST 2.0 Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI) США. Конструювання і підбір праймерів проводили з використанням пакету програм «Vector NTI Advanced v.11» (Invitrogen, США). **Результати досліджень.** З метою підбору ефективних праймерів для постановки ПЛР нами було проведено порівняльне вивчення нуклеотидних послідовностей геному ізолятів IPNV різних генотипів. Для роботи були синтезовані олігонуклеотидні праймери, що фланкують послідовності гена білка VP2. Розмір ампліфікованого фрагменту ДНК – 620 п.н. Додатково, в дослідженнях, були використані олігонуклеотидні праймери, специфічні до гену нуклеопротеїну (NS). Розмір ампліфікованого фрагменту ДНК – 204 п.н. При перевірці специфічності полімеразної ланцюгової реакції з підібраними праймерами як матриця були використані проби РНК референтних штамів та ізолятів IPNV виділених від малька райдужної форелі в господарствах України. **Висновки.** Розроблена діагностична тест-система на основі зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) є високоспецифічною та чутливою для виявлення та ідентифікації вірусу IPNV в матеріалах різного походження.

Ключові слова: ЗТ-ПЛР, вірус інфекційного панкреатичного некрозу, райдужна форель.



З виникненням потенціальної загрози розповсюдження вірусних хвороб риб та випадків підвищеної загибелі серед лососевих риб в господарствах України, виникла необхідність у вивченні біологічних властивостей виділених патогенів риб та розробки методів їх ідентифікації. Аналіз іхтіопатологічної ситуації на підприємствах, що займаються штучним відтворенням лососевих риб і природних водойм показав, що підвищений інтерес для України в цьому відношенні представляє вірус інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV).

Збудником інфекційного некрозу підшлункової залози лососевих риб є вірус що відноситься до родини *Birnaviridae*, роду *Aquabirnavirus*. [1,4,5]

Вірус викликає епізоотії з високим рівнем смертності молоді лососевих риб при їх штучному відтворенні. Атлантичний лосось (*Salmo salar*) найбільш чутливий вид до цього вірусу в морській воді, при цьому його смертність може досягати 70% і більше. [4] У прісноводній аквакультури найчутливішими до дії вірусу є райдужна форель (*Oncorhynchus mykiss*) і голец (*Salvelinus fontinalis*) [4,5].

Наразі для діагностики IPNV застосовують серологічні (імуноферментний аналіз (ІФА), реакція віруснейтралізації (РН)), вірусологічні (ізоляція вірусу в чутливих перещеплюваних культурах клітин (ЕРС, FHM, RTG), постановка біопроби на чутливих видах риб) та молекулярно-біологічні (зворотно-транскриптазна полімеразна ланцюгова реакція (ЗТ-ПЛР) методи [6–8,10].

Високий рівень контагіозності та смертності риб при IPNV, особливо при штучному вирощуванні риби в господарствах індустріального типу, зумовлює необхідність розроблення і застосування експрес-методів діагностики, з метою якнайшвидшої ідентифікації збудника.

Мета роботи: розробити діагностичну тест-систему для виявлення та ідентифікації інфекційного панкреатичного некрозу форелі на основі ЗТ-ПЛР.

Матеріали та методи

Віруси: вірус інфекційного некрозу підшлункової залози штам референтний – Ab (8,0 lg ТЦД50 /см³); українські ізоляти – VF-11(6,8 lg ТЦД50 /см³), VF-08 (6,2 lg ТЦД50 /см³), вірус геморагічної симтецимії форелі (VHSV), штам «DH4p101» [AY546581] (8,0 lg ТЦД50 /см³). Усі штамми та ізоляти вірусів підтримувалися у лабораторній колекції ІРГ НААН.

Перещеплювальні лінії клітин риб: FHM (хвостове стебло чорного толстоголова) [9], RTG (гонади райдужної форелі) [13,14] .

Поживні середовища, розчини та сироватки: середовища Ігла (основне), Ігла MEM, Ігла MEM з подвійним набором амінокислот і вітамінів (2MEM), 199, DMEM /F12 (Sigma), сироватка крові плоду



ВРХ, розчин трипсину (0,25%), розчин версену (0,02%), 1М Нерес-буфер (рН 7,0).

Титр вірусу визначали за методом Ріда та Менча [12].

Для виділення IPNV, доставлені в лабораторію 20 проб патологічного матеріалу (5 риб /проба) були досліджені у відповідності до вимог міжнародних документів з вірусологічних досліджень риби [2,11].

Виділення РНК із зразків, реакцію зворотної транскрипції та полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) виконували за допомогою комерційних наборів: «Рибозоль-А», «РЕВЕРТА-L» та «АмплиСенс 200-1» («АмплиСенс», Росія).

Для виявлення та ідентифікації вірусу інфекційного панкреатичного некрозу форелі були використані дві пари олігонуклеотидних праймерів.

Для пошуку та аналізу гомології генів білків VP2 і NS вірусу інфекційного панкреатичного некрозу використовували програму BLAST 2.0 Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI) США [3].

Конструювання і підбір праймерів проводили з використанням пакету програм «Vector NTI Advanced v.11» (Invitrogen, США)[3].

Результати досліджень та їх обговорення

Підбір праймерів є ключовою ланкою ПЛР, оскільки ними визначається можливість специфічної ампліфікації необхідної послідовності.

Згідно з результатами аналізу нуклеотидних послідовностей вірусів інфекційного панкреатичного некрозу різних генотипів, проведеного Blake з співавт., середній рівень варіабельності геному становить 7%, а специфічні для кожного генотипу ділянки розміщені в генах білка оболонки VP 2 та генах не структурного білка NS [6]. Найконсервативнішим є сегмент геному А, що кодує домен структурного білка **VP 2 та не** структурного білка NS. Тому підбір праймерів проводився в межах даної ділянки геному.

Послідовність кожної з пар праймерів до IPNV була комплементарною консервативним ділянкам гену капсидного білка VP2 та гену NS вірусу. Використання різних праймерів зумовлено тим, що в генах капсидного білка можливі незначні генетичні зміни, спричинені мутаціями під впливом різних факторів. Ці зміни можуть призводити до проблем, пов'язаних з детекцією вірусних послідовностей. І тому, з метою перекрити більшу частину гену капсидного білка досліджуваних вірусів було вирішено використати різні пари праймерів.

Для розрахунку вищезазначених праймерів використовувалися зареєстровані в GenBank нуклеотидні послідовності геномів ізолятів IPNV різних генотипів. У результаті для роботи були синтезовані олігонуклеотидні праймери, що фланкують послідовності гена білка VP2. Оригінальні олігонуклеотидні праймери мали таку послідовність: F 5'- ATGAATTTCGAACCCAGGA -3' та R 5'-GCGAATTCTGATTG-



GTCTGA-3'. Для цієї реакції температурний профіль проведення реакції складав: 1 цикл при 95 °С — 3 хв.; 2 цикл — денатурація при 95 °С — 30 с, гібридизація праймерів при 62 °С — 30 с, елонгація при 72 °С — 60 с, цикл 2 повторюють 40 разів; 3 цикл — при 72 °С — 7 хв. Розмір ампліфікованого фрагменту ДНК — 620 п.н.

В дослідженнях додатково використані олігонуклеотидні праймери, специфічні до гену нуклеопротеїну (NS) з послідовністю F 5'-AAAGC-CATAGCCCATGAAC- 3' та R 5'-TCTCATCAGCTGGCCCAGCTAC-3'. При цьому температурний профіль проведення реакції складав: 1 цикл при 95 °С — 4 хв.; 2 цикл — денатурація при 94 °С — 30 с, гібридизація праймерів при 60 °С — 30 с, елонгація при 72 °С — 60 с, цикл 2 повторюють 35 разів; 3 цикл — при 72 °С — 7 хв. Розмір ампліфікованого фрагменту ДНК — 204 п.н.

Для перевірки специфічності розроблених праймерів і відпрацювання умов реакції були підготовлені контрольні зразки референтного штаму IPNV «Ab» та українські ізоляти VF-11 та VF-8. Віруси пасажували в культурі клітин FHM. Репродукція вірусу супроводжувалася появою цитопатичної дії (ЦПД) впродовж 24–48 години. З метою порівняння ефективності виявлення IPNV використані обидві пари підібраних праймерів. Результати реакції наведені на рис. 1 та рис. 2.

При дослідженні встановлено, що з референтними штамами IPNV працюють обидві пари праймерів, при цьому виявлявся продукт ампліфікації 620 та 204 п.н. відповідно. Також при тестуванні цих систем були отримані позитивні результати з ізолятами IPNV, які попередньо були відтестовані на культурі клітин.

При перевірці специфічності полімеразної ланцюгової реакції з підібраними праймерами як матрицю використали проби культурального матеріалу, інокульованого ізолятами вірусу IPNV та клінічні матеріали від риб, що мали ознаки гострої форми захворювання. Для проведення аналізу були відібрані і приготовані гомогенати окремих органів: печінка, нирки, селезінка. Як негативний контроль слугували відібрані аналогічні матеріали з контрольної групи (попередньо тестовано на наявність вірусних інфекцій). Результати відображені на рис. 3.

В результаті реакції РНК вірусу була виявлена у всіх інфікованих пробах культурального матеріалу й у 2-х пробах органів малька райдужної форелі, підтверджуючи при цьому наявність вірусної РНК безпосередньо у патологічному матеріалі.

На сьогодні існує реальна небезпека поширення IPNV територією України, що створює загрозу значних матеріально-економічних втрат спеціалізованим господарствам, що займаються штучним вирощуванням форелі.

Комерційні набори для виявлення вірусу за допомогою методу імуноферментного аналізу (ІФА) виготовляють фірми Чехії, мають низьку чутливість, потребуючи концентрації вірусомісного матеріалу та є недостатньо специфічними.



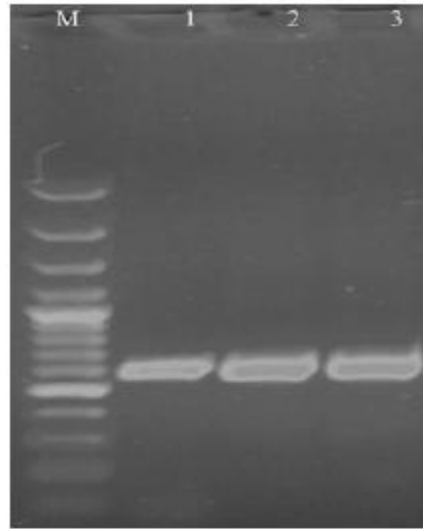


Рис. 1. Електрофоретичний аналіз в 1,5 % гелі агарози продуктів ЗТ-ПЛР з праймерами до гену білка VP2

М — маркер «100 bp DNA Ladder» (Fermentas); 1 — референтний штам IPNV «Ab», в культурі клітин RTC-2; 2 — ізолят VF-11 IPNV в культурі клітин FHM ; 3 — ізолят VF-08 IPNV в культурі клітин FHM

Fig. 1. Electrophoretic analysis in 1.5% agarose gel products RT-PCR with primers to the gene protein VP2

М — marker «100 bp DNA Ladder» (Fermentas); 1 — reference strain IPNV «Ab», in cell culture RTC-2, 2 — VF-11 isolate IPNV in cell culture FHM; 3 — VF-08 isolate IPNV in cell culture FHM

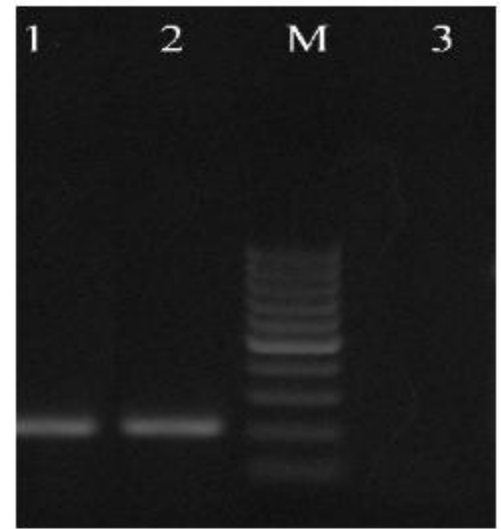


Рис. 2. Електрофоретичний аналіз в 1,5 % гелі агарози продуктів ЗТ-ПЛР з праймерами до гену білка NS

М — маркер «100 bp DNA Ladder» (Fermentas); 1 — референтний штам IPNV «Ab», в культурі клітин FHM; 2 — ізолят VF-11 IPNV в культурі клітин FHM; 3 — негативний контрольний зразок референтний штам ВВГС «DH4p101» в КК RTG-2

Fig.2 Electrophoretic analysis in 1.5% agarose gel products RT-PCR with primers to the gene protein NS

М — marker «100 bp DNA Ladder» (Fermentas); 1 — A reference strain of IPNV «Ab», in cell culture FHM; 2 — VF-11 isolate IPNV in cell culture FHM; 3 — negative control sample reference strains VHS «DH4p101» in cell culture RTG-2

Дослідження останніх років показали, що вибіркова ампліфікація ділянок вірусного геному за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), доповнюючи серологічні методи, здатна значно розширити можливості виявлення IPNV безпосередньо в клінічних зразках [6–8].

В разі необхідності підвищення чутливості діагностичного дослідження можливим є використання гніздового варіанту ЗТ-ПЛР, де для першої реакції використовуються праймери VP2, а для другої — праймери NS.

Отримані результати наших досліджень свідчать про те, що розроблений ПЛР-метод виявлення IPNV дозволяє значно підвищити рівень діагностики вірусних хвороб риб, а його перевагами, крім високої чутливості та можливості тестування безпосередньо патологічного матеріалу, можна вважати відносну простоту виконання за допомогою



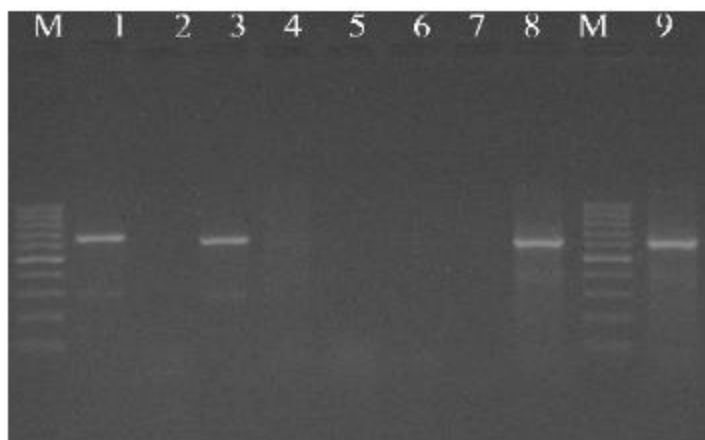


Рис. 3. Електрофоретичний аналіз в 1,5 % гелі агарози продуктів ЗТ-ПЛР

М – маркер «100 bp DNA Ladder» (Fermentas) 1 – гомогенат органів цьоголітки форелі з клінічними ознаками інфекційного панкреатичного некрозу; 2 – гомогенат органів здорової форелі (негативний контроль); 3 – гомогенат органів цьоголітки форелі з клінічними ознаками інфекційного панкреатичного некрозу; 4–6 – гомогенат органів здорової форелі (негативний контроль); 7 – негативний контроль (культуральний неінфікований матеріал); 8 – ізолят VF-11 IPNV в КК RTG-2; 9 – ізолят VF-11 IPNV в КК FHM.

Fig 3. Electrophoretic analysis in 1.5% agarose gel products RT-PCR

М – marker «100 bp DNA Ladder» (Fermentas), 1 – homogenates of underyearling trout with clinical signs of infectious pancreatic necrosis, 2 – homogenates of healthy trout (negative control); 3 – homogenates of underyearling trout with clinical signs of infectious pancreatic necrosis; 4–6 – homogenates of healthy trout (negative control), 7 – negative control (cultural uninfected material) 8 – VF-11 isolate IPNV in cell culture RTG-2; 9 – VF-11 isolate IPNV in cell culture FHM.

традиційного ПЛР-обладнання із звичайним методом детекції результатів реакції електрофорезом в агарозі.

Розроблена діагностична тест-система є високоспецифічною та чутливою для виявлення та ідентифікації вірусу IPNV в матеріалах різного походження (патологічний, культуральний, тощо). Запропоновано використовувати метод ПЛР як високочутливий метод у діагностиці вірусу інфекційного панкреатичного некрозу райдужної форелі.

Н.Н. Матвиенко¹, Л.П. Бучацкий,¹ О.Н. Дерябин²

¹Институт рыбного хозяйства НААН, 03164, ул. Обуховская, 135, Киев

²Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов микроорганизмов, 03151, ул. Донецкая, 30, Киев

ПРИМЕНЕНИЯ ОБРАТНО-ТРАНСКРИПТАЗНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

Реферат

Цель работы: разработать диагностическую тест-систему для обнаружения и идентификации инфекционного панкреатического некроза форели на основе обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). **Материалы и методы.** Вирусы: вирус инфекционного некроза поджелудочной железы: штамм референтный — Ab (8,0 lg ТЦД50/м³) украинские изоляты — VF-11 (6,8 lg ТЦД50/см³), VF-08 (6,2 lg ТЦД50/см³), вирус геморрагической симтецимии форели (VHSV), штамм «DH4p101» [AY546581] (8,0 lg ТЦД50/см³). Перевиваемые линии клеток рыб: FHM (хвостовой стебель черного толстоголова) и RTG (гонады радужной форели). Для выявления и идентификации вируса инфекционного панкреатического некроза форели были использованы две пары олигонуклеотидных праймеров. Для поиска и анализа гомологии генов белков VP2 и NS вируса инфекционного панкреатического некроза использовали программу BLAST 2.0 Национального центра биотехнологической информации (NCBI) США. Конструирование и подбор праймеров проводили с использованием пакета программ «Vector NTI Advanced v.11» (Invitrogen, США). **Результаты исследований.** С целью подбора эффективных праймеров для постановки ПЦР нами было проведено сравнительное изучение нуклеотидных последовательностей генома изолятов IPNV разных генотипов. Для работы были синтезированы олигонуклеотидные праймеры, которые фланкируют последовательности гена белка VP2. Размер амплифицированного фрагмента ДНК — 620 п.н. Дополнительно, в исследованиях, были использованы олигонуклеотидные праймеры, специфические к гену нуклеопротеинов (NS). Размер амплифицированного фрагмента ДНК — 204 п.н. При проверке специфичности полимеразной цепной реакции с подобранными праймерами в качестве матрицы были использованы пробы РНК референтных штаммов и изолятов IPNV выделенных от малька радужной форели в хозяйствах Украины. **Выводы.** Разработана диагностическая тест-система на основе обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) является высокоспецифической и чувствительной для выявления и идентификации вируса IPNV в материалах различного происхождения.

Ключевые слова: ОТ-ПЦР, вирус инфекционного панкреатического некроза, радужная форель.



N.M. Matvienko¹, L.P. Buchatsky¹, O.M. Deryabin²

¹Institute of Fisheries of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine,
135 Obukhivska St., 03164, Kyiv, Ukraine, e-mail: mmarine73@mail.ru

²State Scientific Control Institute of Biotechnology and Microorganism strains,
Donetskaya Str. 30, 0315, Kyiv, Ukraine

**APPLICATION OF THE REVERSE TRANSCRIPTASE
POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DETECTION
AND IDENTIFICATION OF THE INFECTIOUS
PANCREATIC NECROSIS VIRUS OF RAINBOW TROUT
(*ONCORHYNCHUS MYKISS*)**

Summary

Purpose: To develop a diagnostic test system for detection and identification of infectious pancreatic necrosis virus of trout based on the reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Materials and methods:** Viruses: infectious pancreatic necrosis virus, reference strain – Ab (8.0 lg TCID/cm³); Ukrainian isolates – VF-11(6.8 lg TCID/cm³), VF-08 (6.2 lg TCID/cm³), viral hemorrhagic septicemia virus of trout (VHSV), strain «DH4p101» [AY546581] (8.0 lg TCID/cm³). Finite cell line of fish: FHM (fathead minnow peduncle) and RTG (rainbow trout gonads). For detection and identification of infectious pancreatic necrosis virus of trout, two pairs of oligonucleotide primers were used. For search and analysis of gene homology of VP2 and NS proteins of infectious pancreatic necrosis virus, we used the BLAST 2.0 software of the National Center for Biotechnological Information (NCBI), USA. Constructing and matching of the primers were performed with the use of the «Vector NTI Advanced v.11» software package (Invitrogen, USA). **Findings:** For selecting effecting primers for PCR, we performed comparative study of nucleotide sequences of IPNV isolate genome of different genotypes. As a result, for the work we synthesized oligonucleotide primers, which flank VP2 protein gene sequence. The size of the amplified DNA fragment is 630 p.n. Additionally, we used oligonucleotide primers specific for the nucleoprotein gene (NS). The size of the amplified DNA fragment is 204 p.n. When checking the specificity of the polymerase chain reaction with matched primers as a matrix, we used RNA samples of the reference IPNV strains and isolates isolated from rainbow trout fingerlings from different fish farms of Ukraine. **Conclusions:** The developed diagnostic test system based on the reverse transcriptase chain reaction (RT-PCR) is highly specific and sensitive for detection and identification of IPNV virus in the materials of various origins.

Key words: RT-PCR, infectious pancreatic necrosis virus, rainbow trout.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Головина Н. А., Бауер О. Н. . Иктиопатология. — М.: Мир, 2007. — 448 с.
2. Вирусология. Методы: Пер. с англ / Под.ред. Б.Мейхи. — М: Мир, 1988. — 344 с.
3. Лысенко Е.А. Современные методы молекулярной биологии: Полимеразная цепная реакция. Стратегия подбора праймеров для анализа экспрессии генов. — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. — С. 75–96.
4. Ahne W., Negele R.D. Studies on the transmission of infectious pancreatic necrosis virus via eyed eggs and sexual products of salmonid fish. //In: Ellis, A.E. (Ed.), Fish and Shellfish Pathology. Academic Press. London. 1985. — P. 262–270.
5. Antychowicz J. Choroby ryb srodladowych Antychowicz J. — Warszawa: Panstwowe Wydawnictwo Rolnicze i Lesne, — 2007. — 447 p.
6. Blake S.L., Schill W.B., McAllister P.E., Lee M.K., Singer J.T., Nicholson B. L. Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay. // J Clin Microbiol. — 1995. — V. 33(4). — P. 835–839.
7. Cutrin J.M., Barja J.L.; Nicholson B.L.; Bandin I., Blake S.; Dopazo C.P. Restriction fragment length polymorphisms and sequence analysis: an approach for genotyping Infectious pancreatic necrosis virus reference strains and other aquabirnaviruses isolated from northwestern Spain // Appl. Environm. Microbiol., — 2004. — № 70.V 2. — P. 1059–1067.
8. Dadar M., Peyghan R., Memari Hamid Rajabi. Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus isolated from Iranian reared rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in 2012 // Virus Genes- September 2013. — Springer, Part of Springer Science+Business Media <http://link.springer.com/article/10.1007/s11262-013-0981-4>
9. Gravell, M., Malsberger R.G. A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*). //Ann. N.Y. Acad. Sci. — 1965. — V. 126. — P. 555–565.
10. Matvienko N, Buchatsky L, Deryabin O. Isolation of IPN virus from rainbow trout in the Ukraine // Diseases of Fish and Shellfish, (Split, September 12-16.2011):abstract book. — 2011. — P. 363.
11. OIE. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals Fourth Edition, (Chapter 2.1.8.). — 2003. <http://www.oie.int/doc/ged/D6505.PDF>
12. Reed L., Muench H. A simple method of estimating 50 % endpoints // Amer. J. Hygiene. — 1938. — V. 27. — P. 493–497.
13. Wolf K., Quimby. M. C.. Established eurythermic line of fish cells in vitro. Science (Washington DC) . — 1962. — V. 135. — P. 1065.
14. Wolf K., Gravell M., Malsberger R. G. Lymphocystis virus: Isolation and propagation in centrarchid fish cell lines. Science . — 1966. — V. 151. — P. 1004–1005

Стаття надійшла до редакції 28.10.2013 р.

