

УДК 573.6
М75

Рецензент:

Иванов Игорь Николаевич — доктор медицинских наук,
профессор кафедры судебной медицины ГБОУ ВПО СЗГМУ
им. И. И. Мечникова

Молекулярная морфология. Методы флуоресцентной М75 и конфокальной лазерной микроскопии / Д. Э. Коржевский, О. В. Кирик, Е. Г. Сухорукова [и др.] ; под ред. Д. Э. Коржевского. — Санкт-Петербург : СпецЛит, 2014. — 111 с.

ISBN 978-5-299-00642-1

В этой книге в краткой форме изложен материал, необходимый для освоения современных методов конфокальной лазерной микроскопии. Часть из описанных в тексте практических приемов разработана и усовершенствована авторами издания. Отличительной особенностью данной книги является сочетание ключевых моментов из теории современных методов микроскопии с примерами использования различных приемов конфокальной микроскопии и иммуноцитохимии на практике. В приложениях приводятся необходимые сведения о спектральных характеристиках флуорохромов и протоколы иммуноцитохимических реакций, использованных авторами для получения изображений препаратов и построения трехмерных реконструкций микроскопических объектов.

Настоящее руководство может являться справочным пособием для специалистов, применяющих в своей работе флуоресцентные методы и конфокальную микроскопию, а также будет полезно для студентов биологических и медицинских факультетов, изучающих морфологические и нейробиологические дисциплины.

Издание подготовлено при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-15-00014).

УДК 573.6

ISBN 978-5-299-00642-1

© ООО «Издательство „СпецЛит“», 2014

Коллектив авторов

Коржевский Дмитрий Эдуардович — доктор медицинских наук, заведующий лабораторией функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН;

Кирик Ольга Викторовна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН;

Сухорукова Елена Геннадьевна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН;

Колос Елена Андреевна — младший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН;

Карпенко Марина Николаевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории нейробиологии интегративных функций мозга физиологического отдела им. И. П. Павлова ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН;

Суфиева Дина Азатовна — бакалавр биологии;

Назаренкова Анна Владимировна — бакалавр биологии

ОГЛАВЛЕНИЕ

Условные сокращения	6
Предисловие	8
Глава 1. Флуоресцентная микроскопия и конфокальная лазерная микроскопия — принципы и основные методы (<i>М. Н. Карпенко</i>)	10
1.1. Основные понятия	10
1.2. Устройство флуоресцентного микроскопа	14
1.3. Принципы конфокальной микроскопии	18
1.4. Мультифотонная микроскопия	23
1.5. Конфокальная микроскопия в применении к исследованию динамических процессов и межмолекулярных взаимодействий	24
1.5.1. Восстановление флуоресценции после фотоотбеливания (Fluorescence Recovery After Photobleaching — FRAP)	24
1.5.2. Потеря флуоресценции во время фотоотбеливания (Fluorescence Lossin Photobleaching — FLIP)	25
1.5.3. Локализация флуоресценции после фотоотбеливания (Fluorescence Localization After Photobleaching — FLAP)	25
1.5.4. Фёрстеровская (флуоресцентная) резонансная передача энергии (Förster (Fluorescence) Resonance Energy Transfer — FRET)	26
<i>Литература</i>	27
Глава 2. Флуоресцентные красители и другие флуоресцирующие вещества, применяемые в морфологических исследованиях (<i>Е. А. Колос, Д. Э. Коржевский</i>)	29
2.1. Ядерные флуоресцентные красители	30
2.1.1. Цианиновые красители	32
2.1.2. Фенантридины	37
2.1.3. Акридиновые красители	38
2.1.4. Производные индола и имидазола	39
2.2. Индикаторы ионов	40
2.3. Флуоресцентные нейротрейсеры	41
2.4. Флуоресцентные метки	44
2.5. Флуоресцентные белки — генетически кодируемая флуоресцентная метка	46
<i>Литература</i>	48
Глава 3. Конфокальная микроскопия и иммуноцитохимическое исследование (<i>Д. Э. Коржевский, О. В. Кирик</i>)	54
3.1. Особенности начальных этапов пробоподготовки	55
3.1.1. Фиксация материала	56
3.1.2. Декальцинация	57
3.1.3. Обезвоживание и заливка в парафин	58
3.1.4. Изготовление срезов	59

3.2. Процесс окрашивания препаратов для конфокальной микроскопии	60
3.2.1. Приемы, используемые для повышения чувствительности реакций иммунофлуоресценции	61
3.2.2. Приемы, используемые для раздельного выявления нескольких антигенов	63
3.3. Учет эффекта автофлуоресценции	65
<i>Литература</i>	66
Глава 4. Выявление синаптических структур нервной системы и их пространственная реконструкция с использованием конфокальной микроскопии (Д. Э. Коржевский, Е. А. Колос, О. В. Кирик)	68
<i>Литература</i>	72
Глава 5. Трехмерная визуализация патологических структур в центральной нервной системе человека (Е. Г. Сухорукова)	74
<i>Литература</i>	78
Глава 6. Изучение выстилки желудочков головного мозга с использованием методов конфокальной лазерной микроскопии (О. В. Кирик, Д. А. Суфиева, А. В. Назаренкова, Д. Э. Коржевский)	81
<i>Литература</i>	87
Приложения	89
1. Флуоресцентные красители, наиболее часто применяемые для окраски ядер клеток	89
2. Органические флуорохромы, используемые для маркировки антител и конъюгации со стрептавидином	91
3. Флуоресцирующие белки и их спектральные характеристики	93
4. Иммуноцитохимическая реакция на синаптофизин	95
5. Двойная иммуноцитохимическая реакция на синаптофизин и глутаматдекарбоксилазу	98
6. Иммуноцитохимическая реакция на GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок)	101
7. Иммуноцитохимическая реакция на виментин	104
8. Двойная иммуноцитохимическая реакция на виментин и GFAP	107
9. Двойная иммуноцитохимическая реакция на альфа-тубулин и GFAP	109

УСЛОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

АТ-пара	— пара нуклеотидов аденин — тимин
АТФаза	— аденозинтрифосфатаза
ГАМК	— гамма-аминомасляная кислота
ГДК	— глутаматдекарбоксилаза
ГЦ-пара	— пара нуклеотидов гуанин — цитозин
дцДНК	— двухцепочечная ДНК
ММ	— молекулярная масса
НК	— нуклеиновые кислоты
оцДНК	— одноцепочечная ДНК
ПЦР	— полимеразная цепная реакция
РНК	— рибонуклеиновая кислота
СФ	— синаптофизин
ФСБ	— фосфатно-солевой буфер
ФЭУ	— фотоэлектронный умножитель
ЦПМ	— цитоплазматическая мембрана
ЭПР	— эндоплазматический ретикулум
ЭФР	— эпидермальный фактор роста
5-TAMRA	— 5-carboxytetramethylrhodamine
CCD-матрица	(ПЗС-матрица) — charge-coupled device (прибор с зарядовой связью)
DABCO	— диазобизциклооктан
DAPI	— 4,6-диамидино-2-фенилиндол
DMD	— digital micromirror device (цифровые микрозеркальные устройства)
EB	— этидия бромид
FITC	— флуоресцеинизотиоцианат
FLAP	— Fluorescence Localization After Photobleaching (локализация флуоресценции после фотоотбеливания)
FLIM	— fluorescence lifetime imaging microscopy (микроскопия для исследования времени жизни флуоресценции)
FLIP	— Fluorescence Loss in Photobleaching (потеря флуоресценции во время фотоотбеливания)
FRAP	— Fluorescence Recovery After Photobleaching (восстановление флуоресценции после фотоотбеливания)
FRET	— Förster (Fluorescence) Resonance Energy Transfer (Фёрстеровская (флуоресцентная) резонансная передача энергии)
GPDH	— глицерофосфатдегидрогеназа
LDH	— лактатдегидрогеназа
PBFI	— potassium-binding benzofuran isophthalate

PI	— пропидия йодид
PPDA	— парафенилендиамин
RITC	— родаминизотиоцианат
SBFI	— sodium-binding benzofuran isophtalate
SDS	— додецилсульфат натрия
SHIM	— Second-harmonic imaging microscopy (микроскопия с использованием регистрации второй гармоники)
SNAP25	— Synaptosomal-Associated Protein, 25 kD
SNARE	— Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor
TRITC	— тетраметилродамин-5(6)-изотиоцианат

ПРЕДИСЛОВИЕ

В последние годы благодаря достижениям квантовой физики, молекулярной биологии и иммуноцитохимии, классические морфологические дисциплины приобрели совершенный инструмент для молекулярного анализа клеточных и тканевых структур. Сейчас можно констатировать, что на основе всестороннего использования новых молекулярных подходов происходит выделение передового направления в морфологии — молекулярной морфологии. Молекулярная морфология, аккумулируя знания, накопленные классической гистологией, эмбриологией, и патологической анатомией, способна занять ключевое место в интеграции клеточной биологии, биохимии, физиологии, молекулярной генетики и протеомики при решении фундаментальных проблем и прикладных задач биомедицинских исследований. Молекулярная морфология, используя постоянно расширяющиеся возможности новых методов конфокальной микроскопии, а также оптической микроскопии сверхвысокого разрешения, в скором времени должна решить насущную задачу создания нового поколения методов трехмерного молекулярного анализа клеточных и тканевых структур, пригодных для использования не только в практике научного исследования, но и в диагностических целях. Ожидаемые новые методы должны быть просты, надежны в использовании, высокоселективны и высокочувствительны. Успешное решение поставленной задачи требует от исследователя глубоких знаний о современных методических приемах иммуноцитохимии, флуоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии.

Одной из важных задач, стоящих перед морфологом, занимающимся научными исследованиями, является участие в комплексных исследовательских программах, объединяющих специалистов разного профиля с целью решения конкретной научной проблемы. Квалифицированному специалисту-морфологу для успешного выполнения задач комплексных междисциплинарных исследований уже недостаточно владения только основами общей, частной морфологии и патологии, но требуется также и понимание главных биофизических принципов, лежащих в основе феноменов, используемых при создании приборов, предназначенных для флуоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии. Без этого невозможно разобраться в сложных настройках современных приборов, от правильного использования которых зависит окончательный результат

кропотливой подготовительной работы. Облегчить специалистам-морфологам и научным работникам смежных специальностей знакомство с новыми методами микроскопии и показать, как можно с их помощью решать различные задачи, связанные с изучением структур клеток и тканей, должна помочь настоящая книга.

Технической базой для реализации представленных в приложениях протоколов и иллюстраций, помещенных на вкладышах, послужил комплекс оборудования и программного обеспечения, разработанный фирмой Zeiss (Германия), который включает конфокальные лазерные микроскопы LSM 710 и LSM 510 Meta. Иммуноцитохимические протоколы и общие принципы работы с конфокальным микроскопом универсальны и могут успешно использоваться с оборудованием любых производителей.

Настоящее руководство аккумулирует многолетний опыт сотрудников лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии Института экспериментальной медицины, связанный с использованием методов конфокальной лазерной микроскопии и иммуноцитохимии.

Научные исследования, результаты которых использованы при написании этой книги, были выполнены при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-15-00014).

Д. Э. Коржевский

Глава 1. ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ И КОНФОКАЛЬНАЯ ЛАЗЕРНАЯ МИКРОСКОПИЯ — ПРИНЦИПЫ И ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ

Большинство биологических объектов обладают низким контрастом внутренних структур, которые в основном прозрачны, поэтому возможности их наблюдения методом классической микроскопии светлого поля ограничены. Эта проблема может быть преодолена несколькими путями: применением метода исследования в темном поле, использованием метода фазового контраста, для двулучепреломляющих материалов применяют поляризационный контраст. Основным же методом контрастирования в биологии является окрашивание препаратов веществами, способными связываться с препаратом и поглощать свет или флуоресцировать. Последние называют флуорохромами.

1.1. Основные понятия

Флуорохромы (флуоресцентные красители)¹ — это вещества, которые способны связываться с объектом и расходовать часть энергии поглощенного света на флуоресценцию. Под флуоресценцией понимают способность ряда веществ после поглощения света с одной длиной волны излучать свет с другой длиной волны. Напомним, что электроны в атомах расположены на энергетических уровнях; расстояние между уровнями является характеристикой молекулы. При облучении вещества светом возможен переход электронов на более высокий энергетический уровень. Разница энергии между энергетическими уровнями и частота колебаний поглощенного света связаны между собой уравнением Бора (постулат Бора):

$$\Delta E = h\nu = h \cdot c/\lambda,$$

где ΔE — разность энергий между уровнями; ν — частота; λ — длина волны; h — постоянная Планка; c — скорость света.

После поглощения света часть полученной системой энергии расходуется в виде тепла, а часть может быть излучена в виде фото-

¹ В русскоязычной литературе понятия «флуорофор» и «флуорохром» обычно не различают, однако иногда под термином «флуорохром» подразумевают собственно флуоресцирующую молекулу, а под «флуорофором» — конъюгат флуорохрома с макромолекулой либо флуоресцирующий компонент сложной макромолекулярной структуры.

на. Согласно правилу Стокса, длина волны испускаемого света больше, чем длина волны поглощаемого, или, другими словами, максимум спектра излучения сдвинут по отношению к максимуму спектра поглощения в сторону более длинных волн. С физическими основами описанных выше процессов более подробно можно ознакомиться в учебнике Р. Фейнмана (2011).

Каждый флуорохром характеризуется определенным спектром поглощения и испускания. Например, один из самых распространенных флуоресцентных красителей — FITC (fluorescein-5-isothiocyanate) — имеет максимум поглощения $\lambda_{ex} = 492$ нм, а максимум излучения для него составляет $\lambda_{em} = 518$ нм. Другой распространенный флуорохром, 5-TAMRA (5-carboxytetramethylrhodamine), имеет $\lambda_{ex} = 543$ нм и $\lambda_{em} = 570$ нм. На величину стоксова сдвига также влияет полярность среды, в которой находится флуорохром.

Наиболее интенсивной флуоресценции флуорохрома можно добиться, облучая его светом с длиной волны, близкой к максимуму поглощения, однако возможно перевести флуорофор в возбужденное состояние и при облучении его светом с длиной волны, существенно отличающейся от его максимума поглощения. Например, флуорофор можно перевести в возбужденное состояние двумя или тремя длинноволновыми фотонами (мультифотонное возбуждение), что будет эквивалентно возбуждению одним коротковолновым фотоном. Так, возбуждение двумя или тремя фотонами с длиной волны 900 нм эквивалентно возбуждению одним фотоном с длиной волны 450 или 300 нм.

Еще одной характеристикой флуорохрома является *квантовый выход* — отношение интенсивности поглощаемого и испускаемого света. Квантовый выход (Q) может быть выражен через отношение интенсивности флуоресценции (F) к разности интенсивностей падающего (I_0) и выходящего (I) световых потоков:

$$Q = \frac{F}{I_0 - I}.$$

Заметим, что квантовый выход всегда меньше единицы из-за «стоксовских» потерь. В зависимости от квантового выхода флуорохромы разделяют на слабые и сильные. Современные синтетические флуорохромы, как правило, обладают высоким квантовым выходом и являются сильными.

Для характеристики способности флуорохрома поглощать свет определенной длины волны вводят понятие *молярного коэффициента экстинкции*, который определяется как оптическая плотность одномолярного раствора вещества при толщине светопоглощающе-

го слоя в 1 см. Молярный коэффициент поглощения имеет размерность $л \cdot моль^{-1} \cdot см^{-1}$. Он зависит от природы вещества и от длины волны проходящего света. Величина, полученная путем перемножения молярного коэффициента экстинкции на величину квантового выхода, характеризует яркость флуоресценции флуорохрома при заданной длине волны. Время облучения, при котором флуорохром теряет 50 % яркости, называют фотостабильностью. «Идеальный» флуорохром должен иметь высокий квантовый выход и хорошую фотостабильность. Современные флуорохромы на основе полупроводниковых нанокристаллов (квантовых точек) по этим показателям на порядок превосходят органические соединения (Олейников В. А., 2011).

Еще один важный параметр — *время жизни возбужденного состояния*, которое определяется как среднее время нахождения молекулы в возбужденном состоянии до того, как вернуться в основное состояние. Время затухания флуоресценции флуорохрома (τ) описывается формулой:

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k},$$

где Γ — константа скорости излучательной дезактивации флуорофора; k — обобщенная константа скорости безызлучательной дезактивации.

Обычно время затухания флуоресценции составляет около 10 нс.

Тушением флуоресценции называют любые процессы, которые уменьшают интенсивность флуоресценции данного вещества. К тушению может приводить множество процессов: химические реакции в возбужденном состоянии, перенос энергии, образование комплексов, тушение при столкновениях. К тушению флуоресценции относятся также процессы кажущегося тушения, которое обусловлено оптическими свойствами образца (высокая оптическая плотность, мутность). Для тушения флуоресценции требуется контакт между молекулами флуорохрома и тушителя. Если тушитель диффундирует к флуорохрому, пока последний находится в возбужденном состоянии, и в результате контакта флуорохром возвращается в основное состояние без излучения фотона, говорят о динамическом тушении. Статическое тушение происходит при образовании нефлуоресцирующего комплекса между флуорохромом и тушителем. При увеличении концентрации флуорохрома возможно самотушение флуоресценции как результат поглощения молекулами вещества собственного излучения. Возможно также по-

глошение флуоресцентного излучения одного флуорохрома другим. К тушителям флуоресценции относят молекулярный кислород, ароматические и алифатические амины, ксенон, пероксид водорода, акриламид, оксид азота, нитрометан, нитроксида, хлороформ, трихлорэтанол, бромбензол. Следует отметить, что не все флуорохромы тушатся любыми из вышеперечисленных веществ, однако (в зависимости от условий эксперимента) почти всегда можно подобрать эффективную пару флуорохром-тушитель или, напротив, избежать тушения флуоресценции (что более важно в морфологических исследованиях).

Для флуорохромов характерна *анизотропия флуоресценции*. Анизотропия — это зависимость свойств вещества от направления. При возбуждении поляризованным светом селективно возбуждаются только те молекулы флуорохрома, для которых дипольный момент перехода при поглощении параллелен электрическому вектору возбуждающего излучения. Такое селективное возбуждение частично ориентированного набора флуорохромов приводит к частично поляризованному испусканию флуоресценции. В общем случае анизотропия флуоресценции r выражается формулой:

$$r = (I_v - I_h)/(I_v + 2I_h),$$

где I_v и I_h — интенсивности флуоресценции вертикально и горизонтально поляризованного испускания в случае возбуждения образца вертикально поляризованным светом.

При планировании экспериментов с использованием флуорохромов, особенно флуорохромов нового поколения — квантовых точек — необходимо учитывать возможность *мерцания флуоресценции*. Это стохастический процесс перехода флуорохрома из флуоресцирующего состояния в состояние отсутствия флуоресценции, несмотря на постоянное возбуждение. В результате, при наблюдении за одиночными флуоресцирующими комплексами возникает стробоскопический эффект (зрительная иллюзия неподвижности или мнимого движения предмета при его прерывистом наблюдении). Кроме этого, поскольку время нахождения флуорохрома во «включенном» и «выключенном» состоянии является случайным, сравнение результатов независимых экспериментов при использовании таких флуорохромов затруднено. При конфокальной микроскопии данный эффект может быть компенсирован за счет линейного или покадрового усреднения сканируемых изображений.

1.2. Устройство флуоресцентного микроскопа

Прототип флуоресцентного микроскопа был разработан в начале XX в. Августом Келлером, который при конструировании микроскопа использовал в качестве источника света дуговую кадмиевую лампу. Затем немецкий физик Генри Фридрих Зидентопф, работая в оптических мастерских Цейса (в 1907—1938 гг. директор лаборатории микроскопии), совместно с Рихардом Зигмонди изобрел (1903) щелевой ультрамикроскоп. Еще через восемь лет (1911) Oskar Heilmstädt сконструировал первый флуоресцентный микроскоп и применил его для исследования явления автофлуоресценции органических и неорганических объектов. Однако в то время было трудно добиться эффективного разделения флуоресцентного сигнала от возбуждающего света. Эта проблема была преодолена Philipp Ellinger и August Hirt в 1929 г., которым удалось разработать так называемый эпифлуоресцентный микроскоп. В предложенной ими конфигурации микроскопа освещение препарата и детекция флуоресцентного сигнала осуществлялась с одной стороны от образца, поэтому объектива достигал только отраженный возбуждающий и излучаемый свет. Прорыв в развитии флуоресцентной микроскопии связан с появлением лазеров (60-е гг. XX в.), с помощью которых удалось добиться высокой степени пространственной и временной когерентности светового пучка. Кроме того, стало возможным эффективно разделять сигналы, используя дихроичные зеркала.

Принципиальная схема современного флуоресцентного микроскопа представлена на рис. 1.

Свет от источника проходит через фильтр возбуждающего излучения. При этом из спектра выделяются только те компоненты, которые необходимы для возбуждения флуоресценции. Затем свет попадает на дихроичное зеркало (светоделитель). Отраженный светоделителем свет попадает в объектив флуоресцентного микроскопа и фокусируется на образце, возбуждая флуоресценцию. Флуоресцентный сигнал (смещенный в длинноволновую область (согласно Правилу Стокса)), а также рассеянное излучение возбуждения достигает светоделителя, но, в отличие от возбуждающего света, проходит через дихроичное зеркало, после чего рассеянное излучение отсеивается эмиссионным фильтром и на детектор попадает только излучение флуоресценции.

Источник возбуждающего света. В настоящее время используют три типа источников света: лампы высокой мощности (ртутные, ксеноновые и их аналоги), диоды и лазеры. Ртутная лампа — это газоразрядный источник света, в котором при электрическом разряде в парах ртути под высоким давлением возникает оптическое излуче-

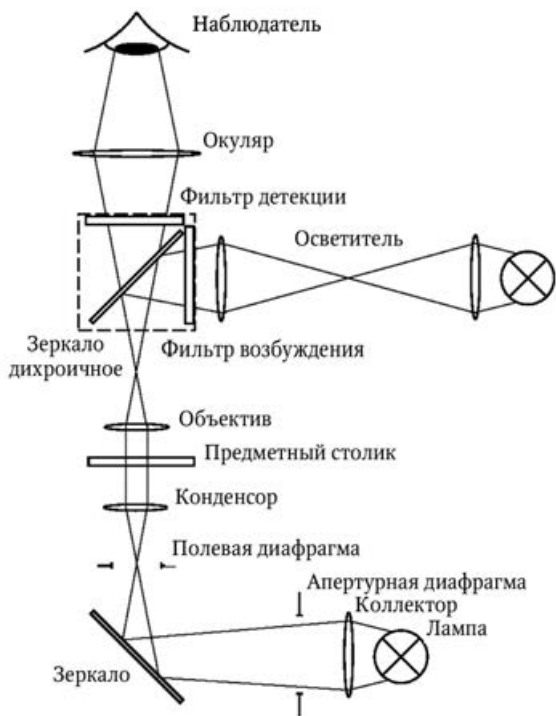


Рис. 1. Принципиальная схема флуоресцентного микроскопа

ние преимущественно в ультрафиолетовой области спектра. Такие источники света являются малоэффективными, поскольку они производят большое количество избыточной тепловой и световой энергии по сравнению с энергией, требуемой для возбуждения флуоресценции. Флуоресцентные микроскопы могут быть укомплектованы ртутными лампами мощностью 50–200 W. Использование более мощной лампы позволяет возбудить с достаточной эффективностью даже слабый флуорохром, но при этом необходимо учитывать, что увеличение мощности лампы влечет за собой увеличение скорости выгорания флуорохромов.

В ксеноновой лампе вспышка происходит после ионизации газа и прохождения через него мощного импульса электрического тока, поданного на поджигающий электрод. В результате этого электроны в молекуле ксенона занимают орбиты с более высокими энергетическими уровнями и, возвращаясь на прежние орбиты, излучают энергию в виде фотонов. Ксеноновая лампа имеет непрерывный

Учебное издание

МОЛЕКУЛЯРНАЯ МОРФОЛОГИЯ

Методы флуоресцентной и конфокальной
лазерной микроскопии

Руководство

Под редакцией Д. Э. Коржевского

Редактор *Пугачева Н. Г.*

Корректор *Полушкина В. В.*

Дизайн и компьютерная верстка *Илюхиной И. Ю.*

Подписано в печать 23.10.2014. Формат 60 × 88¹/₁₆.
Печ. л. 7 + 0,75 печ. л. цв. вкл. Тираж 1000 экз. Заказ №

ООО «Издательство „СпецЛит“».

190103, Санкт-Петербург, 10-я Красноармейская ул., 15,

тел./факс: (812) 495-36-09, 495-36-12,

<http://www.speclit.spb.ru>.

Отпечатано в типографии «L-PRINT»,
192007, Санкт-Петербург, Лиговский пр., 201, лит А, пом. 3Н.

ISBN 978-5-299-00642-1



9 785299 006421