

УДК 576.08

СЛАДКОВА Е.А.
SLADKOVA E.A.

ОЦЕНКА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА МИТОГЕН-ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ЛИМФОЦИТОВ

THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATUS
OF MITOGEN-TRANSFORMED LYMPHOCYTES

Аннотация

С использованием методов атомно-силовой микроскопии получены новые данные о структуре и свойствах трансформированных лимфоцитов. Показано, что конкановалин А-стимулированные клетки имеют рифленую плазмалемму с преобладанием крупных глобул. Одновременно происходит увеличение жесткости и потенциала их поверхности. Установленные структурно-функциональные особенности пролиферирующих *in vitro* лимфоцитов могут быть использованы в качестве модели для исследования опухолевого перерождения клеток крови.

Ключевые слова: трансформация лимфоцитов; митоген; упруго-эластические свойства; потенциал поверхности; рельеф поверхности, атомно-силовая микроскопия.

Abstract

The new data on the structure and properties of mitogen-transformed lymphocytes' was obtained using the methods of atomic-force microscopy. The study demonstrates that Con-A-stimulated cells have grooves in the plasmalemma with the predominance of large globules. Their stiffness and potential surface increase simultaneously. The discovered structural and functional features of proliferating *in vitro* lymphocytes can be used as a model in the studies of tumor blood cell degeneration.

Key words: lymphocytes transformation; mitogen; elastic properties; surface charge; surface form; atomic-force microscopy.

Трансформированные клетки, в том числе лимфоциты, существенно отличаются от нормальных по своей морфологии [1]. Показано, что трансформацию клеток как *in vivo*, так и *in vitro* могут вызывать различные стимулы (вирусы, канцерогены и т.п.). Однако не зависимо от природы трансформирующего фактора,

интерес к изучению структурно-функциональных особенностей перерождающихся лимфоцитов продиктован возможностью определения ключевых моментов в формировании опухолевого фенотипа клеток в организме человека. Рядом работ показаны аналогии в поведении клеток, трансформированных *in vitro* и прошедших опу-

холевое перерождение [2]. В частности, у таких клеток происходят однотипные нарушения регуляции адгезии и подвижности [3], обусловленные перестройками структур цитоскелета [4], что способствует распластыванию клеток или приобретению ими шаровидной формы [5]. Кроме того, трансформация лимфоцитов непосредственно связана с изменением структуры и функций их плазмалеммы, прежде всего ее электрических [6] и механических свойств [7].

Целью нашей работы явилась оценка структуры и функциональных свойств митоген-стимулированных лимфоцитов.

Материалы и методы исследования. Экспериментальная работа выполнена на кафедре анатомии и физиологии живых организмов НИУ «БелГУ». Объект исследования – лимфоциты периферической крови здоровых доноров, стимулированные Кон А. Контролем служили лимфоциты, культивированные в питательной среде без митогена.

Забор периферической крови здоровых доноров осуществляли из локтевой вены с участием специализированного медперсонала клинической лаборатории областной больницы г. Белгорода. Для сбора крови использовали вакуумные пробирки Vacuette КЗЕ, содержащие сухую ЭДТА в концентрации 2,0 мг на 1 мл крови. Разделение пробы крови на лейкоциты и эритроциты проводили путем центрифугирования в течение 10 мин при 1000 об./мин, полученную надосадочную жидкость и лейкоцитарное кольцо отбирали, затем центрифугировали еще 10 мин при той же скорости. В конечном результате получали суспензию лейкоцитов.

Для исследований готовили по 25 проб опытной группы из лейкосуспензии, культивированной с Кон А, и контрольной –

без митогена. Культивирование лимфоцитов осуществляли по следующей схеме: для приготовления 1 пробы 1 мл свежесодержанной суспензии лейкоцитов соединяли с 5 мл питательной смеси [8] и инкубировали в течение 48 часов при 37°C в присутствии 5% CO₂. В опытной группе к культуральной среде добавляли 0,02 мл Кон А. Доза митогена была выбрана согласно известным методикам [9]. По окончании времени инкубации из каждой пробы отбирали 4,5 мл питательной среды, оставшуюся часть которой перемешивали с лейкоцитарной массой, находящейся на дне инкубационной пробирки.

Морфологию и микрорельеф поверхности лимфоцитов изучали в полуконтактном режиме на АСМ ИНТЕГРА Вита фирмы NT-NDT (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71). Пробоподготовку для АСМ-исследования проводили следующим образом: суспензию лейкоцитов наносили на обезжиренное предметное стекло и помещали во влажную камеру. Сканирование 15 клеток из пробы осуществляли согласно разработанному «Способу исследования нативных клеток крови» (патент № 2009125268). На полученных сканах измеряли геометрические параметры лимфоцитов и анализировали неоднородности их клеточной поверхности, используя при этом следующие программные продукты: для расчета высоты (h, мкм) и диаметра (d, мкм) клеток – Nova (NT-MDT, Россия), для расчета площади (S, мкм²) и объема (V, мкм³) клеток – Gwyddion (Gwyddion.net). С целью оценки структурных неоднородностей клеточной поверхности строили кривые профиля бокового сечения (рис. 1).



Рис.1. Профиль бокового сечения лимфоцита

Проводили подсчет количества, измеряли линейные размеры углублений и глобулярных выступов на участке плазмалеммы площадью 3×3 мкм.

Упруго-эластические свойства лимфоцитов изучали в режиме силовой спектроскопии [10]. Исследования проводили с использованием модифицированного зонда, изготовленного на основе полимерных микросфер, прикрепленных к типлессу серии CSG 11, согласно «Способу определения упругости клеток крови» (патент № 2466401). Регистрировали силовые кривые отвода и подвода кантилевера с поверхности 30 клеток из каждой пробы. Полученные силовые кривые обрабатывали на основе модели Герца в модификации Снедона [11].

С целью изучения потенциала поверхности (ПП) в одиночных лимфоцитах проводили его измерение в режиме зонда Кельвина на АСМ [10]. Суспензию лейкоцитов для измерения потенциала поверхности (ПП) готовили согласно «Способу регистрации изменения поверхностного заряда» (патент РФ № 2027188). Готовили препараты на обезжиренной металлической подложке. Измерение потенциала поверхности (ПП) осуществляли с помощью кантилевера с токопроводящим

титановым покрытием серии NSG03/TiN (Nanoworld, USA). Из каждой пробы сканировали по 15 клеток и проводили обработку полученных сканов в программе Nova (Зеленоград, 2009).

Миграционную активность белых клеток крови оценивали с помощью реакции торможения миграции лимфоцитов (РТМЛ) [12]. Использовали методику РТМЛ в прямом капиллярном тесте [13]. Вычисляли процент мигрировавших клеток по методу Новикова Н.Д. [14].

С целью изучения пространственного расположения и измерения длины пучков филаментов цитоскелетных структур лимфоцитов здоровых доноров и больных лейкозом готовили цитологические препараты. Методика приготовления цитологических препаратов включала следующие этапы: стабилизация элементов цитоскелета, лизис мембран, фиксация клеток и их окраска для световой микроскопии [15]. Анализ цитологических препаратов осуществляли с помощью комплекса аппаратно-программной (АПК) визуализации изображения «ВидеоТестМастерМорфология» (производитель НПФ «ВидеоТест», Санкт-Петербург, рег. удостоверение № 29/20010702/6102-04 от 16.02.2004). Для визуализации цитоскелетных структур использовали программное обеспечение «Видео-Тест-Размер 5.0» (НПФ «ВидеоТест», Санкт-Петербург). На полученных препаратах наблюдали лимфоцитарные формы с темноокрашенным ядром и просветленной цитоплазмой, в области которой выявляли сеть фибрилл. На каждом препарате изучали по 30 клеток. Определяли особенности расположения структур цитоскелета в клетках и измеряли длину пучков филаментов, отдельные нити фибрилл визуализировать не удалось.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение. В лейкосуспензии здоровых доноров, инкубированной с Кон А, обнаружены субпопуляции клеток разных размеров. На основе величин диаметров лимфоциты были разделены на 3 группы: микроциты – клетки в диаметре до 5 мкм, нормоциты – 5,1-10 мкм, бласты – свыше 10 мкм. Микроциты и нормоциты имели округлую форму. Лимфобласты обладали неправильными контурами цитоплазмы, располагающейся широким ободком вокруг ядра.

В рельефе поверхности микроцитов доноров отмечено присутствие глобулярных образований (рис. 2). Переход субпопуляции микроцитов в более зрелые формы – нормоциты – сопровождался потерей большей части морфологических образований плазмалеммы. Глобулярные выступы плазмалеммы нормоцитов имели округлую форму, крупных инвагинаций не выявлено. Рельеф лимфобластов был сглажен.

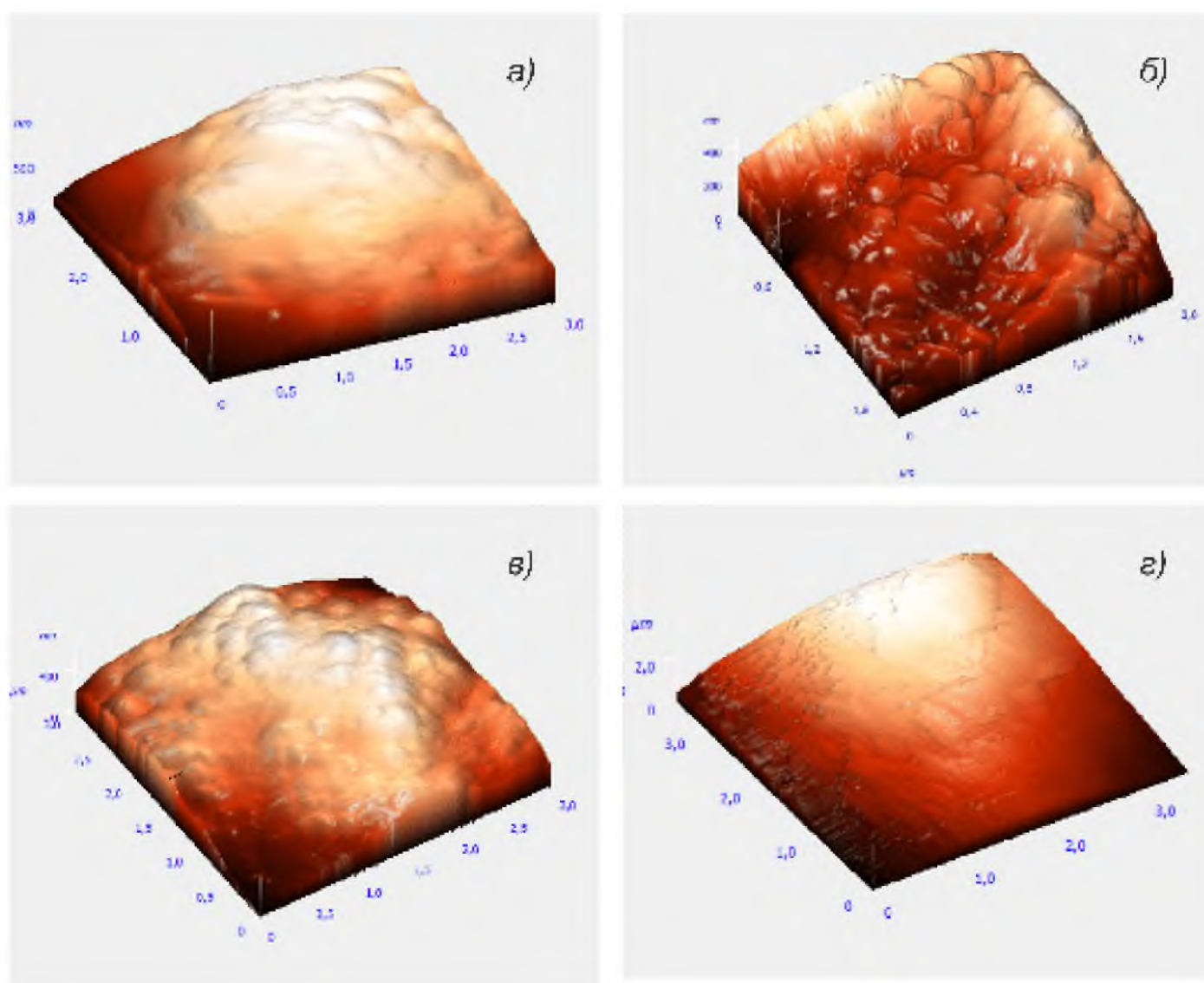


Рис. 2. Рельеф поверхности лимфоцитов:
а – без воздействия Кон А; б – микроциты; в – нормоциты; г – бласты

Элементы цитоскелета в субпопуляции микроцитов, культивируемых с Кон А, представлены сетью, направленной радиально от ядра клетки к периферии (рис. 3). В субпопуляции нормоцитов наблюдали смещение ядра к полюсу клетки, в результате чего сеть элементов цитоскелета располагалась с одной стороны, про-

зывая слой не полностью лизированной цитоплазмы. В лимфобластах визуализировали густую сеть из тонких пучков элементов цитоскелета, располагающихся в зоне перинуклеарного пространства, отдельные пучки которых расходились радиально к периферии.

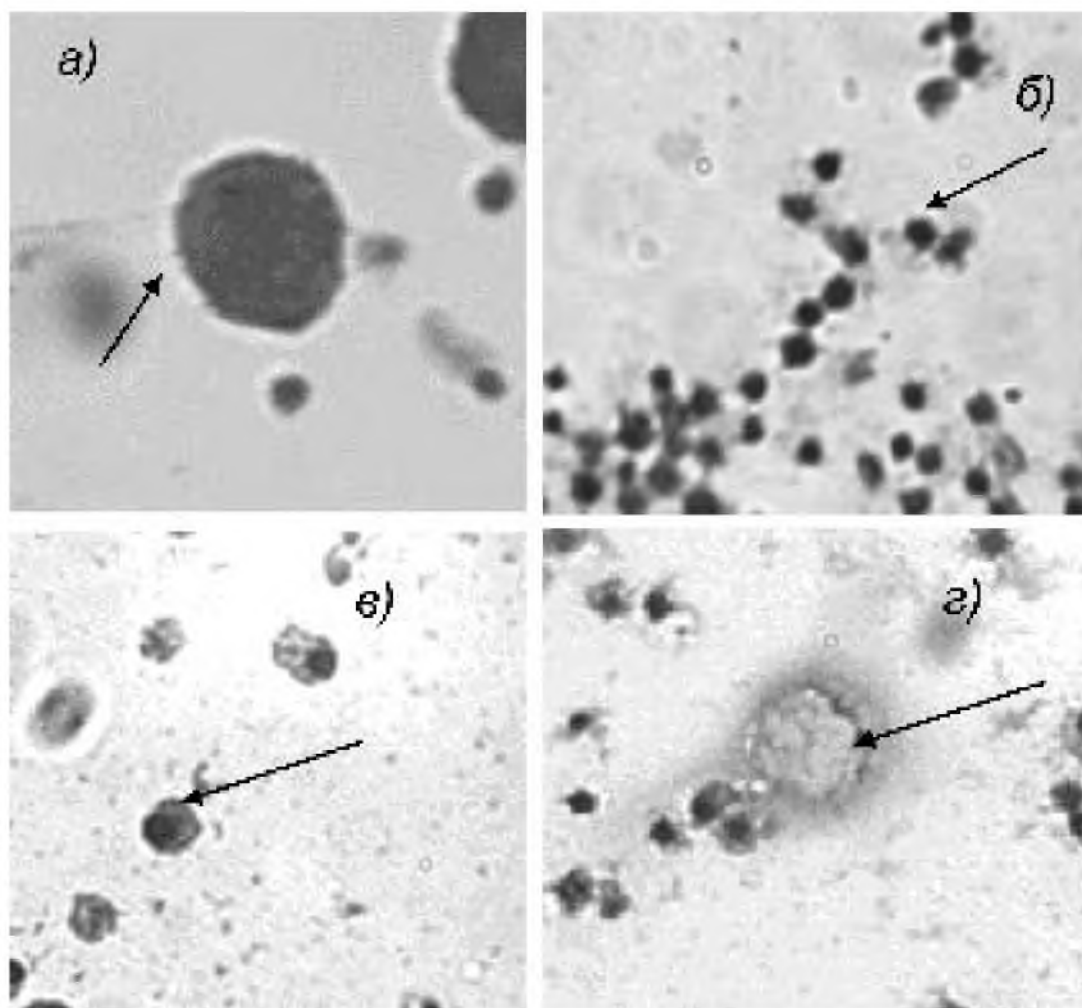


Рис. 3. Элементы цитоскелета лимфоцитов:

а – без воздействия; Кон А; б – микроциты; в – нормоциты; г – бласты (стрелкой показаны пучки цитоскелетных структур, располагающихся вокруг ядра)

Проанализированы морфология и функциональные параметры субпопуляции митоген-стимулированных нормоцитов. В качестве контроля были нормоциты без митогенной стимуляции. В результате проведенного анализа установлено снижение площади поверхности и объема клеток, стимулированных Кон А, соответственно на 8% и 3% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (табл. 1).

Заряд клеточной поверхности под влиянием Кон А увеличился на 77% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (см. табл. 1). Жесткость плазмалеммы возросла на 110% ($p < 0,05$). Под действием Кон А длина структур цитоскелета «жестких» нормоцитов достоверно не отличалась от контроля, но двигательная активность снизилась на 61% ($p < 0,05$).

Таблица 1

Морфофункциональные параметры лимфоцитов

Параметр	Нормоциты без воздействия Кон А	Нормоциты, инкубированные с Кон А
Площадь поверхности, мкм ²	80,4±0,3 ^a	74,1±0,2
Объем, мкм ³	39,1±0,8 ^a	39,9±0,6
Диаметр, мкм	6,3±0,8	5,9±0,2
Высота, мкм	0,9±0,1	0,9±0,1
Модуль Юнга, мПа	3,9±0,1 ^a	8,2±0,9
Потенциал поверхности, мВ	-37,3±0,2 ^a	-21,1±0,5
Длина пучков цитоскелета, мкм	0,78±0,2	0,9±0,2
Процент мигрировавших клеток, %	20,3±0,8 ^a	7,9±0,3

^a Статистически достоверные различия между значениями лимфоцитов без воздействия Кон А и инкубированных с Кон А

В условиях митогенной стимуляции существенно изменилась морфология клеточной поверхности нормоцитов. Под влиянием Кон А глубина и ширина инваги-

наций возросли соответственно на 47% и 55% (p<0,05) по сравнению с нормоцитами контрольной группы (рис. 4).

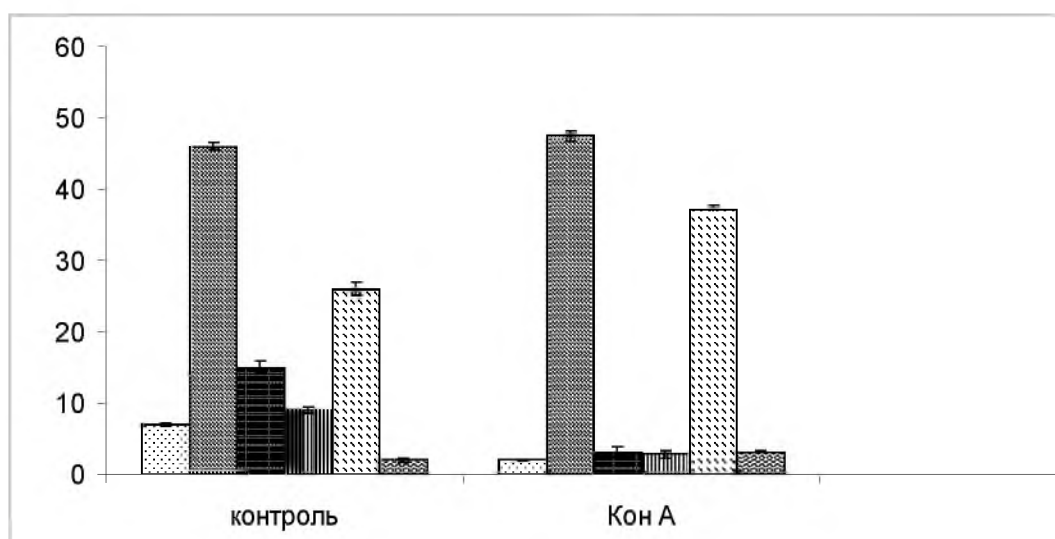


Рис. 4. Морфометрические параметры структурных образований поверхности лимфоцитов

Ширина глобулярных образований нормоцитов снизилась на 79% ($p < 0,05$). При этом количество глобул и инвагинаций на поверхности уменьшилось соответственно на 71% и 70% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Нами проведено исследование влияния Кон А на лимфоциты здоровых людей с целью создания модели интенсивной пролиферации клеток с последующим изучением особенностей их морфофункциональной организации. Под влиянием Кон А лимфоциты вступали в цикл деления. В результате чего наблюдали появление нескольких субпопуляций клеток, различающихся как морфологически, так и функционально. Установлено увеличение размеров и сглаживание рельефа поверхности в ряду микроциты – нормоциты – бласты.

Кон А-стимулированные нормоциты характеризуются мелкими размерами и повышенной жесткостью по сравнению с контролем. Вероятно, под действием Кон А в таких клетках происходят активные процессы биосинтеза цитокинов [16], которые упаковываются в гранулы и скапливаются в подмембранном слое, способствуя повышению жесткости клетки. Известно, что упруго-эластические свойства клеток крови тесно связаны с организацией подмембранных структур цитоскелета [17], однако в проведенном исследовании существенных различий в расположении и длине элементов цитоскелета между нормоцитами опытной и контрольной групп не выявлено. При активации лимфоцитов Кон А происходит поток ионов Ca^{2+} внутрь клетки [18], что в свою очередь ведет к деполяризации клеточной мембраны [19]. Данная схема изменения ПП согласуется с полученными нами результатами в пробах с Кон А.

Изменение свойств поверхности Кон А-стимулированных нормоцитов сопровождалось появлением крупных глобулярных образований и снижением двигательной активности. По данным литературы митоген-сти-

мулированные лимфоциты активно синтезируют фактор LMIF, снижающий скорость полимеризации актиновых филаментов [20]. В свою очередь локализация G-актина в отдельных участках клетки может спровоцировать кластеризацию ее мембраны [21].

Заключение. Использование АСМ-инструментария позволило установить изменения ультраструктуры, упруго-эластических свойств и потенциала поверхности Кон А-стимулированных лимфоцитов, которые могут быть использованы в качестве индикатор трансформации клеток. Появление на поверхности Кон А-стимулированных лимфоцитов крупных глобул сопровождается увеличением жесткости и потенциала поверхности, что обуславливает снижение их двигательной активности. Выявленные особенности морфофункциональной организации лимфоцитов при интенсивной пролиферации *in vitro* могут быть использованы для понимания ключевых моментов, способствующих опухолевому перерождению лимфоцитов в организме человека.

Литература:

1. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells / Mani S.A., Guo W., Liao M.J., Eaton E.N., Ayanan A., Zhou A.Y., Brooks M., Reinhard F., Zhang C.C., Shipitsin M., Campbell L.L., Polyak K., Brisken C., Yang J., Weinberg R.A. // *Cell*. 2008. V.133. P. 704-715.
2. Фултон А. Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки. [Пер. с англ.] М.: Мир, 1987. 120 с.
3. Yamazaki K., Allen T.D. Ultrastructural morphometric study of efferent nerve terminals on murine bone marrow stromal cells and the recognition of a novel anatomical unit: The 'neuro-reticular complex' // *Am J Anat*. 1990. V. 187. P. 261-276.
4. Шутова М.С. Изменения актинового цитоскелета и динамики клеточного края, определяющие характер клеточной миграции при трансформации фибробластов: Автореф. дис. ... к-та биол. наук. 2010. 23 с.

5. Small J. V. The actin cytoskeleton. *Electron Microsc. Rev.* 1998. V. 1. P. 155-174.

6. Тарасова И.М. Изменение физико-химических свойств лимфоцитов в процессах развития индуцированного канцерогенеза и общей реакции на повреждение: Дис. ... к-та физ.-мат. наук. Москва. 1985. 187 с.

7. Горло Е.И. Структурно-функциональное состояние мембран клеток крови и лимфы у онкологических больных при различных химиотерапевтических воздействиях: Автореф. ... к-та биол. наук. Ростов-на-Дону. 2000. 24 с.

8. Фролова И.В. Готовая форма питательной среды для культивирования лимфоцитов периферической крови человека // *Биотехнология*. 1994. № 9. С. 22-25.

9. Эшмен Р.Ф. Активация лимфоцитов // *Иммунология*. [Под ред. У. Пола]. М.: Мир. 1987. Т.1. С. 414-469.

10. Руководство пользователя «Зондовая нанолaborатория Интегра Вита». Зеленоград: Copyright НТМДТ. 2006. 57 с.

11. Wojcikiewicz E., Zhang X., Moy V. Force and compliance measurements on living cells using atomic force microscopy // *Biol. Proced. Online*. 2004. V.6(1). P. 1-9.

12. Хаитов Р. М., Пинегин Б. В., Истамов Х. И. Экологическая иммунология. М.: ВНИРО. 1995. 219 с.

13. Новиков Д.К., Новиков П.Д., Титова И.Д. Иммунокоррекция, иммунопрофилактика, иммунореабилитация. Витебск: ВГМУ. 2006. 198 с.

14. Эшмен Р.Ф. Активация лимфоцитов // *Иммунология*. [Под ред. У. Пола]. М.: Мир. 1987. Т.1. С. 414-469.

15. Ченцов Ю.С., Воробьев И.А., Надеждина Е.С. Простой способ выявления центриолей и цитоскелета в клетках культуры ткани с помощью световой микроскопии // *Цитология*. 1982. Т. 34, № 3. С. 65-71.

16. Signaling pathways involved in the effects of different fatty acids on interleukin-2 induced human lymphocyte proliferation / Gorjao R., Hirabara S., Cury-Boaventura M., Martins de Lima T., Passos M., Curi R. // *Immunology*. 2013. V. 4. P. 1-13.

17. Stossel T.T., Janmey P.A., Zanner K.S. The cortical cytoplasmic actin gel // *Cytomechanics*. 1987. P. 131-153.

18. Toyoshima S., Hoshikawa T., Miyashita M. Contribution of the body parts to throwing performance // *Biomechanics*. 1976. P. 169-174.

19. Шестакова С.В. Физико-химические механизмы активации лимфоцитов лектинами: Автореф. ... к-та биол. наук. Москва. 1985. 25 с.

20. Scielzo C., Ghia P., Conti A. HS1 protein is differentially expressed in chronic lymphocytic leukemia patient subsets with good or poor prognoses // *J. Clin. Invest.* 2005. V. 115(6). P. 1644-1650.

21. Sechi A.S., Wehland J. The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane // *J. Cell Sci.* 2000. V.113. P. 3685-3695.

References:

1. Mani S.A., Guo W., Liao M.J., Eaton E.N., Ayanan A., Zhou A.Y., Brooks M., Reinhard F., Zhang C.C., Shipitsin M., Campbell L.L., Polyak K., Brisken C., Yang J., Weinberg R.A. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells // *Cell*, no. 133. (2008): pp. 704-715.

2. Fulton A. *Tsitoskelet. Arkhitektura i khorografiya kletki* [Cytoskeleton. The Architecture and Choreography of the Cell]. Moscow: Mir, 1987. 120 p.

3. Yamazaki K., Allen T.D. Ultrastructural morphometric study of efferent nerve terminals on murine bone marrow stromal cells and the recognition of a novel anatomical unit: The 'neuro-reticular complex' // *Am J Anat.* 1990. V. 187. pp. 261-276.

4. Shutova M.S. *Izmeneniya aktinovogo tsitoskeleta i dinamiki kletchnogo kraja, opredelyayushchie kharakter kletchnoi migratsii pri transformatsii fibroblastov: Avtoref. dis. ... k-ta biol. nauk* [Changes in the Actinic Cytoskeleton and Dynamics of Cistic Edge Determining the Character of Cell Migration in Fibroblast Transformation: Abstract of PhD Thesis in Biology]. Moscow, 2010. 23 p.

5. Small J. V. The actin cytoskeleton. *Electron Microsc. Rev.* 1998. V. 1. pp. 155-174.

6. Tarasova I.M. *Izmenenie fiziko-khimicheskikh svoystv limfotsitov v protsessah razvitiya indutsirovannogo kantserogeneza i obschei reaktsii na povrezhdenie: Dis. ... k-ta fiz.-mat. Nauk* [Changes in Physical and Chemical Properties of Lymphocytes in the Processes of Induced Carcinogenesis and General Reaction to the Damage: PhD Thesis in Physics and Mathematics]. Moscow. 1985. 187 p.

7. Gorlo E.I. *Strukturno-funktsionalnoe sostoyanie membran kletok krovi i limfy u onkologicheskikh bolnyh pri razlichnykh khimioterapevticheskikh vozdeistviyakh: Avtoref. ... k-ta boil. nauk* [Structural and Functional Condition of Blood and Lymph Cell Membranes in Cancer Patients in Various Chemotherapy Treatments: Abstract of PhD Thesis in Biology]. Rostov-on-Don. 2000. 24 p.

8. Frolova I.V. *Gotovaya forma pitatelnoy sredy dlya kultivirovaniya limfotsitov perifericheskoy krovi cheloveka // Biotekhnologiya* [A Finished Form of Nutrient Solution for Cultivation of Lymphocytes of Human Peripheral Blood // Biotechnology]. no. 9. (1994): pp. 22-25.

9. Eshmen R.F. *Aktivatsiya limfotsitov // Immunologiya* [Activation of Lymphocytes // Immunology]. no.1. (1987): pp. 414-469.

10. *Rukovodstvo polzovatelya "Zondovaya nanolaboratoriya Integra Vita"* [The Manual "Probe Nanolaboratory Integra Vita"]. Zelenograd. Copyright NTMDT. 2006. 57 p.

11. Wojcikiewicz E., Zhang X., Moy V. Force and Compliance Measurements on Living Cells Using Atomic Force Microscopy // *Biol. Proced. Online*. 2004. V.6 (1). pp. 1-9.

12. Khaitov R. M., Pinegin B. V., Istamov Kh.I. *Ekologicheskaya immunologiya* [Ecological Immunology]. Moscow: VNIRO, 1995. 219 p.

13. Novikov D.K., Novikov P.D., Titova I.D. *Immunokorreksiya, immunoprofilaktika, immunoreabilitatsiya* [Immunocorrection, Immunoprophylaxis, Immunorehabilitation]. Vitebsk: VGMU, 2006. 198 p.

14. Eshmen R.F. *Aktivatsiya limfotsitov // Immunologiya* [Activation of Lymphocytes // Immunology]. no.1. (1987): pp. 414-469.

15. Chentsov Yu.S., Vorobyev I.A., Nadezhkina Ye.S. *Prostoy sposob viyavleniya tsentrioley i tsitoskeleta v kletkah kultury tkani s pomoschyu svetovoy mikroskopii // Tsitologiya* [A Simple

Method of Identifying Centrioles and Cytoskeleton in Culture Cells with the Use of Light Microscopy // *Citology*]. no. 34, no. 3. (1982): pp. 65-71.

16. Gorjao R., Hirabara S., Cury-Boaventura M., Martins de Lima T., Passos M., Curi R. Signaling pathways involved in the effects of different fatty acids on interleukin-2 induced human lymphocyte proliferation // *Immunology*. 2013. V. 4. pp. 1-13.

17. Stossel T.T., Janmey P.A., Zanner K.S. The Cortical Cytoplasmic Actin Gel // *Cytomechanics*. 1987. pp. 131-153.

18. Toyoshima S., Hoshikawa T., Miyashita M. Contribution of the body parts to throwing performance // *Biomechanics*. 1976. pp. 169-174.

19. Shestakova S.V. *Fiziko-khimicheskie mekhanizmy aktivatsii limfotsitov lektinami: Avtoref. ... k-ta biol. nauk* [Physical and Chemical Mechanisms of Activating Lymphocytes with Lectins: Abstract of PhD Thesis in Biology]. Moscow, 1985. 25 p.

20. Scielzo C., Ghia P., Conti A. HS1 protein is differentially expressed in chronic lymphocytic leukemia patient subsets with good or poor prognoses // *J. Clin. Invest.* 2005. V. 115(6). pp. 1644-1650.

21. Sechi A.S., Wehland J. The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns (4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane // *J. Cell Sci.* 2000. V.113. pp. 3685-3695.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ

Сладкова Евгения Анатольевна

аспирант

Белгородский государственный национальный исследовательский университет
ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015, Россия
E-mail: evgenija-sladkova00@rambler.ru

DATA ABOUT THE AUTHOR

Sladkova Evgeniya Anatolievna

Postgraduate Student

Belgorod State National
Research University

85, Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia
E-mail: evgenija-sladkova00@rambler.ru