

ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ НАУКА – ПРАКТИЧЕСКОМУ ЗДРАВООХРАНЕНИЮ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 615.451:616.341-008.6].076.0

Андропова Н.В.¹, Черкасова Ж.Р.², Цуркан С.А.², Смирнова Г.Б.¹, Трещалина Е.М.¹

ОЦЕНКА ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ АФП-СОДЕРЖАЩЕГО НЕКОВАЛЕНТНОГО КОМПЛЕКСА АИМПИЛА В МОДЕЛИ ИЗОЛИРОВАННОГО ОТРЕЗКА ТОНКОЙ КИШКИ КРЫС

¹ ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», 115478, г. Москва, Россия;

² ООО «ФНЦ «Фармаксес», 127322, г. Москва, Россия

Исследование посвящено изучению способности меченого комплекса АИМПИЛА-АКРИДИН и тестового соединения АФП-АКРИДИН в концентрации 1 мкг/мл интернализировываться в тонкой кишке. Для этой цели использована модифицированная методика изолированного «вывернутого» отрезка тонкой кишки крысы при помощи разработанной нами новой методики с использованием конъюгата исследуемого комплекса с люминесцентным АКРИДИНОМ в инкубационной среде. Показано, что неспецифическая люминесценция инкубационной среды без метки предельно мала: уровень люминесценции 30–39 RLU является минимальным базовым сигналом и не может существенно влиять на результаты тестирования. Стартовый уровень люминесценции в инкубационной среде после добавления конъюгатов АИМПИЛА-АКРИДИН или АФП-АКРИДИН достаточно высок и составляет 1 073 714 и 1 602 017 RLU соответственно. В просвете «вывернутых» отрезков тонкой кишки уровень люминесценции составлял 548 и 997 и 425–829 RLU.

Полученные данные позволяют считать, что аналогично АФП меченный акридином комплекс АИМПИЛА в относительно невысокой концентрации способен всасываться в тонкой кишке крысы в течение физиологически адекватного времени.

Ключевые слова: нековалентный комплекс АИМПИЛА; АКРИДИН; флэш-люминесценция; интернализация; тонкая кишка; крысы.

Для цитирования: Андропова Н.В., Черкасова Ж.Р., Цуркан С.А., Смирнова Г.Б., Трещалина Е.М. Оценка интернализации АФП-содержащего нековалентного комплекса АИМПИЛА в модели изолированного отрезка тонкой кишки крыс. *Российский онкологический журнал*. 2016; 21 (6): 308–311. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1028-9984-2016-21-6-308-311>

Для корреспонденции: Трещалина Елена Михайловна, д-р мед. наук, проф., руководитель лаборатории комбинированной терапии опухолей НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей; 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24; E-mail: treshalina@yandex.ru.

Andronova N.B., Tcherkassova J.R., Tsurkan S.A., Smirnova G.B., Treshalina H.M.

EVALUATION OF THE INTERNALIZATION OF AFP-CONTAINING NON-COVALENT COMPLEXES AIMPILA IN THE RAT MODEL OF THE ISOLATED SEGMENT OF RAT SMALL INTESTINE

¹ N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, 115478, Russian Federation;

² Ltd Pharmaceutical Research Center «FarmAksess», Moscow, 127322, Russian Federation

Research is devoted to the study of the ability of the labeled complex «AIMPILA-ACRIDIN» and the test compound «AFP-ACRIDIN» in concentration of 1.0 mkg/ml to internalize in a small intestine. For this purpose there was used the modified technique of the isolated inverted small intestinal sac method in rats with the aid of by ourselves delivered technique with the use of a conjugate of the studied complex with luminescent ACRIDIN in the incubatory environment. The nonspecific luminescence of the incubatory environment without label was shown to be extremely low: the level of a luminescence of 30–39 RLU is the minimum basic signal and can't significantly influence on results of testing. The starting level of a luminescence in the incubatory environment after supplementation of conjugates of AIMPILA-ACRIDIN or AFP-ACRIDIN is rather high and accounts of 1073714 RLU and 1602017, respectively. In a gleam of the «inverted» pieces of a small intestine the level of a luminescence accounted of 548 and 997 RLU and 425–829 RLU. The obtained data allow to consider the complex AIMPILA in rather low concentration is capable to absorb in a small intestine of rat over the physiologically adequate time that similar to AFP labeled by ACRIDIN.

Key words: AIMPILA non-covalent complex; ACRIDIN; flash luminescence; internalization; small intestine; rats.

For citation: Andronova N.B., Tcherkassova J.R., Tsurkan S.A., Smirnova G.B., Treshalina H.M. Evaluation of the internalization of AFP-containing non-covalent complexes AIMPILA in the rat model of the isolated segment of rat small intestine. *Rossiiskii onkologicheskii zhurnal. (Russian Journal of Oncology)*. 2016; 21 (6): 308–311. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1028-9984-2016-21-6-308-311>

For correspondence: Helena M. Treshalina, MD, PhD, DSc, Prof., Head of the Laboratory of Combination Therapy of Tumors of the Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors; Moscow, 115478, Russian Federation, E-mail: treshalina@yandex.ru.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received 06 June 2016

Accepted 23 June 2016

Известно, что интернализация белковых или аминокислотных комплексов, витаминов и других нековалентных соединений при пероральном применении происходит в тонкой кишке [1–3].

Как правило, всасывание таких комплексов через стенку тонкой (тощей) кишки и их интернализация, т. е. попадание во внутреннюю среду организма, реализуется различными вариантами пиноцитоза. После прохождения через стенку кишки агент попадает в лимфоидный аппарат кишечника, затем в венозный кровоток и в последнюю очередь – в артериальную кровь [4–6].

Наиболее важный этап всасывания вещества (интернализации) – его абсорбция, т. е. поглощение энтероцитами, что определяется двумя основными параметрами: растворимостью лекарства и его проницаемостью для областей желудочно-кишечного тракта, где происходит абсорбция [7]. Прохождение агента через стенку кишки, которое можно фиксировать с помощью люминесцентной метки в транспортной части комплекса, служит доказательством успешной интернализации [8, 9].

Большие пептиды вообще не всасываются без предварительного гидролиза, поскольку они не проникают через двойной липидный слой. Иногда все же это происходит с некоторыми растительными токсинами, в частности абрином и рицином, а также токсинами ботулизма, холеры и дифтерии, которые всасываются непосредственно в кровь. Этот транспорт до сих пор считают уникальным и загадочным процессом.

Эти особенности всасывания больших молекул и токсинов предполагают возможность интернализации в тонком кишечнике большой молекулы нековалентного комплекса АИМПИЛА, содержащего индуктор апоптоза Атрактилозид А и транспортный белок альфа-фетопротейн (АФП).

Цель исследования – определение интернализации нековалентного комплекса АИМПИЛА в тонкой кишке крысы.

Задачи: разработка методики изучения всасывания меченого препарата АИМПИЛА с использованием изолированного «вывернутого» отрезка тонкой кишки крысы и конъюгированных препаратов с люминесцентной меткой, растворенных в инкубирующем растворе; определение интернализации в тонкой кишке меченых препаратов: тестового соединения АФП-АКРИДИН и препарата АИМПИЛА-АКРИДИН.

Материал и методы

Исследование выполнено на здоровых половозрелых крысах-самках массой тела 150–200 г из питомника «Крюково», которых содержали в виварии ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина» при соответствующих конвенциональных условиях.

Использованы меченые препараты АИМПИЛА-АКРИДИН и в качестве тестового соединения АФП-АКРИДИН, которые добавляли в инкубационную среду в концентрации 1 мкг/мл.

Для конъюгирования препаратов АИМПИЛА и АФП использовали стандартную методику Моро [10], которая заключается в обработке разбавленных до 500 мкг/мл препаратов АИМПИЛА или АФП концентрированным раствором ДМСО (итоговая концентрация составляет 10% w/v) для поддержания

АКРИДИНА в растворе и с последующим добавлением 152 мкг ($2,2 \cdot 10^{-4}$ М) раствора АКРИДИН NHS-эфир (ACRIDINIUM NHS Ester), Мм = 632,6 (Cat № А190925, CAS № 177332-37-5, Toronto Research Chemicals Inc., Канада) в ДМСО при концентрации 4 мг/мл. Растворы инкубировали в течение ночи в темных пробирках, после чего конъюгаты АИМПИЛА-АКРИДИН и АФП-АКРИДИН подвергали диализу против двух смен 0,5 л фосфатно-солевого буфера (ФСБ) с использованием пористых мембранных диализных мешков из регенерированной целлюлозы CelluSep (средний диаметр микропор MWCO 12000–14000 RC и диаметром 25 мм) на ночь, при постоянном перемешивании. После конъюгации и диализа к растворам конъюгатов добавляли Тимеросаль в концентрации 0,02%. Итоговая концентрация конъюгатов определялась при помощи стандартной методики Лоури и составляла 200 мкг/мл для АИМПИЛА-АКРИДИН и 192 мкг/мл для АФП-АКРИДИН.

Для изучения всасывания различных соединений и комплексов в кишечнике существует традиционный метод «вывернутых мешочков» с использованием отрезков тонкой (тощей) кишки крысы [11–14].

Этот метод апробирован на различных животных и доказал свою результативность при исследовании процесса всасывания *in vivo* и *in vitro* при использовании меченых соединений, например липидов или углеводов.

Определение интернализации АИМПИЛА

Для изучения способности АИМПИЛА всасываться в тонкой (тощей) кишке модифицирована описанная ранее методика на крысах с использованием изолированного «вывернутого» отрезка тонкой кишки.

Суть методики состоит в следующем. При аутопсии у крысы выделяли 4 изолированных отрезка тонкой кишки длиной 4–5 см, промывали содержимое каждого отрезка теплым раствором Рингера-Локка $t = 37^\circ\text{C}$ и затем с помощью глазного пинцета быстро выворачивали отрезок для обнажения внутренней части слизистой. В отличие от известной методики один край «вывернутого» отрезка пережимали пластмассовой клипсой, заливали в полость 0,3–0,4 мл теплого раствора Рингера, после чего пережимали второй конец отрезка аналогичной клипсой.

После фиксации краев «вывернутый» отрезок помещали в стеклянный стакан объемом 50 мл с инкубационной средой – раствором Рингера-Локка, нагретым до температуры 37°C с помощью термостата. Использование клипсов обеспечивало простоту выполнения фиксации и гарантировало размещение отрезков на одном уровне и соответственно равный уровень насыщения кислородом. Стакан с фиксированными отрезками кишки в течение 30 мин выдерживали в термостатируемой водяной бане при 37°C (столбик жидкости 5 мм над отрезком кишки) при постоянном ручном перемешивании инкубационной среды для обеспечения адаптации и восстановления естественной моторики. Готовая к проведению опыта система представлена на рисунке (см. вклейку).

В качестве тестового соединения использован

Таблица 1

Интенсивность люминесценции АФП-АКРИДИН при изучении всасываемости с использованием «вывернутого» изолированно отрезка тонкой кишки крысы

№ пробы	Образец	Среднее значение люминесценции, RLU*
1	Инкубационная среда** через 30 мин после внесения метки АФП-АКРИДИН 1 мкг/мл	1 602 017
2	Смыв наружной поверхности отрезка кишки после трехкратной отмывки от метки	59
3	Жидкость из отрезка тонкой кишки (1) после 30 мин после добавления метки в инкубационную среду	548
4	Жидкость из отрезка тонкой кишки (2) после 30 мин после добавления метки в инкубационную среду	997
5	Фон неспецифического сигнала	39

Примечание. Здесь и в табл. 2: * – RLU (relativelight units) – относительные световые единицы уровня АТФ; 1 ед. RLU = 1 фемтомоль (10^{-15} М) АТФ; ** – раствор Рингера–Локка.

АФП-АКРИДИН, добавленный в инкубационную среду в концентрации 1 мкг/мл. Сразу после добавления теста из инкубационной среды брали пробу объемом 0,2 мл для определения значения люминесцентного сигнала растворенного конъюгата в инкубационной среде на флэш-люминометре Glomax фирмы Promega, США. Через 30 мин инкубации с тестом «вывернутый» отрезок извлекали из инкубационной среды, трехкратно отмывали в 0,5 л теплового раствора Рингера–Локка от остаточных количеств метки на поверхности кишки под контролем люминесценции.

Определение интернализации тестового соединения в тонкой кишке выполняли следующим образом. На дистальном конце отмытого отрезка кишки атравматичным металлическим зондом через короткий полунадрез выбирали пробу жидкости в объеме до 0,4 мл и подвергали люминесцентному контролю. В качестве контроля использованы уровни неспецифической люминесценции образцов инкубационной среды без тестового соединения и смыва со стенки отрезка кишки.

Показано (табл. 1), что неспецифическая люминесценция инкубационной среды без метки предельно мала: уровень люминесценции 39 RLU практически не визуализируется и не может существенно влиять на результаты тестирования. Стартовый уровень люминесценции в инкубационной среде после добавления метки достаточно высок и составляет 1 602 017 RLU. Троекратная отмывка отрезка кишки от метки дает следовую люминесценцию на уровне 59 RLU, это позволило пренебречь ею. В просвете двух «вывернутых» отрезков тонкой кишки уровень люминесценции составлял 548 и 997 RLU.

Представленные данные дают возможность заключить, что меченый акридином АФП при относительно невысокой концентрации в течение физиологически адекватного времени способен всасываться в тонкой кишке крысы.

Таблица 2

Интенсивность люминесценции после добавления АИМПИЛА-АКРИДИН в инкубационную среду в тесте «вывернутого» изолированного отрезка тонкой кишки крысы

№ пробы	Образец	Среднее значение RLU*
1	Инкубационная среда** через 30 мин после внесения метки АИМПИЛА-АКРИДИН 1 мкг/мл	1 073 714
2	Смыв наружной поверхности отрезка кишки после трехкратной отмывки от метки	50
3	Жидкость из отрезка тонкой кишки (1) после 30 мин после добавления метки в инкубационную среду	829
4	Жидкость из отрезка тонкой кишки (2) после 30 мин после добавления метки в инкубационную среду	425
5	Жидкость из отрезка тонкой кишки (3) после 30 мин после добавления метки в инкубационную среду	740
6	Жидкость из отрезка тонкой кишки (4) после 30 мин после добавления метки в инкубационную среду	649
7	Фон неспецифического сигнала	30

Оценка всасывания меченного АИМПИЛА в тонкой кишке крысы

Для изучения всасывания в тонкой кишке крысы использован меченый комплекс АИМПИЛА-АКРИДИН, который добавляли в инкубационную среду в концентрации 1 мкг/мл и оценивали по описанной ранее методике.

Показано (табл. 2), что в этом опыте неспецифическая люминесценция инкубационной среды без метки также предельно мала: уровень люминесценции 30 RLU, а стартовый уровень люминесценции в инкубационной среде после добавления метки достаточно высок и составляет 1 073 714 RLU. Троекратная отмывка отрезка кишки от метки дает следовую люминесценцию на уровне 50 RLU, это позволило пренебречь ею. В просвете двух отмытых «вывернутых» отрезков тонкой кишки уровень люминесценции в четырех образцах кишки составлял 425-829 RLU.

Полученные данные позволяют считать, что содержащий АФП меченый акридином комплекс АИМПИЛА в относительно невысокой концентрации способен всасываться в тонкой кишке крысы в течение физиологически адекватного времени.

Люминесцентный анализ образцов

Для оценки трансэпителиального переноса люминесцентных конъюгатов через тонкую кишку крысы мы использовали люминесцентный анализ образцов жидкости на флэш-люминометре Glomax фирмы Promega, США. Образцы инкубационной среды с растворенным конъюгатом, образцы жидкости, взятой из внутренней части вывернутой тонкой кишки, а также образцы смывов забирали в дубликатах в объеме 200 мкл и переносили в лунки 96-луночного черного планшета для люминесценции фирмы Grenier. После этого в каждую лунку добавляли 50 мкл рас-

творя преактиватора, состоящего из 1 мМ азотной кислоты и 0,1% H₂O₂ в дистиллированной воде. После тщательного перемешивания растворов планшет с образцами помещали в прибор флэш-люминометр, который автоматически добавлял в каждую лунку 50 мкл раствора активатора (1 N NaOH) и считывал производимый образцами люминесцентный сигнал. Специфические характеристики, используемые нами для измерения флэш-люминоценции, были следующие: объем активатора 50 мкл/лунку; 1 с задержка между считыванием соседних лунок; время интеграции сигнала 1 с; время накопления сигнала 1 с.

Заключение

Исследование посвящено изучению способности меченого комплекса АИМПИЛА-АКРИДИН и тестового соединения АФП-АКРИДИН в концентрации 1 мкг/мл интернализироваться в тонкой кишке. Для этой цели использована модифицированная методика изолированного «вывернутого» отрезка тонкой кишки крысы при помощи разработанной нами новой методики с использованием конъюгата исследуемого комплекса с люминесцентным акридином в инкубационной среде. Показано, что неспецифическая люминесценция инкубационной среды без метки предельно мала: уровень люминесценции 30–39 RLU является минимальным базовым сигналом и не может существенно влиять на результаты тестирования. Стартовый уровень люминесценции в инкубационной среде после добавления конъюгатов АИМПИЛА-АКРИДИН или АФП-АКРИДИН достаточно высок и составляет 1073714 и 1602017 RLU соответственно. В просвете «вывернутых» отрезков тонкой кишки уровень люминесценции составлял 548 и 997 и 425–829 RLU.

Полученные данные позволяют считать, что содержащий АФП меченый акридином комплекс АИМПИЛА в относительно невысокой концентрации способен всасываться в тонкой кишке крысы в течение физиологически адекватного времени.

Выяснение места интернализации белкового препарата, предназначенного для перорального применения, важно для клинического обоснования его использования в виде капсул.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Artursson P., Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; 175(3): 880–5.
2. Legen I., Kristl A. D-glucose triggers multidrug resistance-associated protein (MRP)-mediated secretion of fluorescein across rat jejunum in vitro. *Pharm. Res.* 2004; 21(4): 635–40.
3. Ершов К.И., Серяпина А.А. Исследование особенностей биодоступности ферментного препарата тромбовазим из тощей кишки крысы. *Медицина и образование в Сибири: электронный журнал.* 2013(4). Режим доступа: <http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/pdf.php?id=1060>
4. Tansey T., Christie D.A., Tansey E.M. *Intestinal Absorption*. London: Wellcome Trust; 2000.
5. Метельский С.Т. Физиологические механизмы всасывания в кишечнике. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* 2009; (3): 51–6.
6. Покровский В.М., Коротко Г.Ф. *Физиология человека.* М.: Ме-

- дицина. 2009; 3-3.
7. Ипатова О.М., Торховская Т.И., Медведева Н.В. и др. Биодоступность пероральных лекарственных форм и способы ее повышения. *Биомедицинская химия.* 2010; 56(1): 101–19.
8. Бурмакин М.В., Селиверстова Е.В., Наточин Ю.В. Накопление желтого флюоресцентного белка в почке после его всасывания в кишечнике у крыс. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* 2005; 91(10): 1195–204.
9. Konishi Y., Hagiwara K., Shimizu M. Transepithelial transport of fluorescein in Caco-2 cell monolayers and use of such transport in vitro evaluation of phenolic acid availability. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002; 66(11): 2449–57.
10. Tcherkassova J., Abramovich C., Moro R. et al. Combination of CA125 and RECAF biomarkers for early detection of ovarian cancer. *Tumor Biol.* 2011; 32(4): 831–8.
11. Иванов Ю.И., Косуба Р.Б. *Способ количественного определения натриуретического фактора. Патент СССР № 631821, 1978.*
12. Багрян А.А., Эккерт Л.Г., Уголев А.М. *Способ определения транспортной функции препарата тонкой кишки. Патент СССР № 927235, 1982.*
13. Вербиловский Я.П., Геращенко И.П., Ющенко И.И., Штатко Е.И. Механохимическое получение и исследование композиции высокодисперсного кремнезема с хлоридами натрия и калия, цитратом натрия и глюкозы. *Хим. фарм. журн.* 2003; 37(12): 45–53.
14. Мосидзе Т.Г. *Способ применения изолированной петли тонкой кишки в качестве искусственной биологической почки. Патент РФ № 2360705, 2009.*

REFERENCES

1. Artursson P., Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; 175(3): 880–5.
2. Legen I., Kristl A. D-glucose triggers multidrug resistance-associated protein (MRP)-mediated secretion of fluorescein across rat jejunum in vitro. *Pharm. Res.* 2004; 21(4): 635–40.
3. Ershov K.I., Seryapina A.A. The study features the bioavailability of the enzyme preparation Trombovazim of the jejunum of rats. *Seriya: Medicine and education in Siberia: electronic journal.* 2013(4). Mode of access: <http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/pdf.php?id=1060> (in Russian)
4. Tansey T., Christie D.A., Tansey E.M. *Intestinal Absorption*. London: Wellcome Trust; 2000.
5. Metel'skiy S.T. Physiological mechanisms of intestinal absorption. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii.* 2009; (3): 51–6. (in Russian)
6. Pokrovskiy V.M., Korot'ko G.F. *Human Physiology.* Moscow: Meditsina; 2009: 3-3. (in Russian)
7. Ipatova O.M., Torkhovskaya T.I., Medvedeva N.V. et al. The bioavailability of oral dosage forms and ways of its improvement. *Biomeditsinskaya khimiya.* 2010; 56(1): 101–19. (in Russian)
8. Burmakina M.V., Seliverstova E.V., Natochin Yu.V. Yellow fluorescent protein accumulation in the kidney after intestinal absorption in rats. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im I.M. Sechenova.* 2005; 91(10): 1195–204. (in Russian)
9. Konishi Y., Hagiwara K., Shimizu M. Transepithelial transport of fluorescein in Caco-2 cell monolayers and use of such transport in vitro evaluation of phenolic acid availability. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002; 66(11): 2449–57.
10. Tcherkassova J., Abramovich C., Moro R. et al. Combination of CA125 and RECAF biomarkers for early detection of ovarian cancer. *Tumor Biol.* 2011; 32(4): 831–8.
11. Ivanov Y.I., Kosuba R.B. *A Method of Quantitative Determination of Natriuretic Factor. Patent USSR № 631821, 1978.* (in Russian)
12. Bagryan A.A., Ekkert L.G., Ugolev A.M. *The Method for Determining the Transport Function of the Small Intestine of the Drug. Patent USSR № 927235, 1982.* (in Russian)
13. Verbilovskiy Ya.P., Gerashchenko I.P., Yushchenko I.I., Shtat'ko E.I. Mechanochemical Synthesis and study of the composition of finely divided silica and potassium chloride, sodium citrate and glucose. *Khim.-farm. zhurn.* 2003; 37(12): 45–53. (in Russian)
14. Mosidze T.G. *Dosing Isolated Intestinal Loops as Biological Artificial Kidney. Patent RF № 2360705, 2009.* (in Russian)

Поступила 06.06.16

Принята к печати 23.06.16

К ст. Н.В. Андроновой и соавт.



Система «вывернутого» изолированного отрезка тонкой кишки крысы.

К ст. Л.Е. Комаровой и соавт.

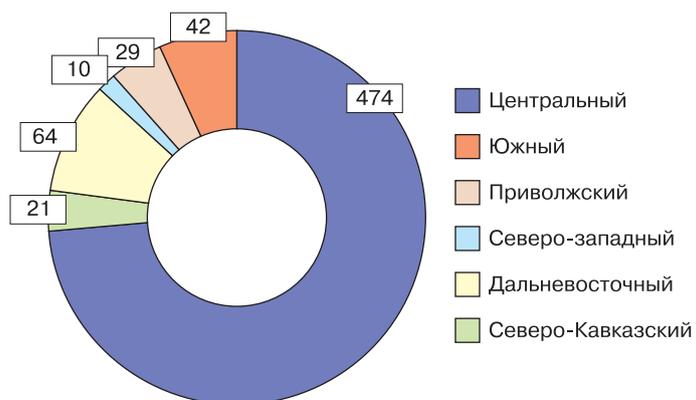


Рис. 1. Распределение больных по Федеральным округам России.

К ст. Е.Б. Гельман-Черни и соавт.



Рис. 2. Вилла Черни.