

DOI <https://doi.org/10.32782/2786-9067-2024-27-7>

УДК 616-092.4:614.8.086.4:685.34.042

РОЛЬ ДОСЛІДЖЕНЬ IN VITRO ДЛЯ ОЦІНКИ ПОТЕНЦІЙНИХ РИЗИКІВ ПРОМИСЛОВИХ ТОКСИКАНТІВ (НА ПРИКЛАДІВ ВЗУТТЄВИХ КЛЕЇВ)

Лотоцька-Дудик У.Б.

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, Україна

Анотація. У сучасних біомедичних дослідженнях для прогнозування токсичності хімічних сполук усе більшої актуальності набуває використання методів на клітинному та молекулярному рівнях, які замінюють класичні парадигми для визначення небезпеки та оцінки ризику.

Метою роботи було дослідити токсичність взуттєвих клеїв за умов *in vitro* на альтернативних тест-системах.

Матеріали та методи: досліджували клеї, які використовуються у технології виготовлення взуття: каучуковий, поліхлоропреновий та поліуретановий. *In vitro* методами були HET-SAM тест, оцінка цитотоксичності на культурах клітин (фібробластах миші лінії Valb/c-3T3 і ембріональних клітинах нирки людини лінії HEK-293) та суспензійній культурі клітин ссавців – сперматозоїдах бугаїв.

Результати: за сукупністю судинних реакцій хоріоалантоїсної оболонки (геморагій, лізису та коагуляції) індекси подразнення становили 7 [7÷8.5] для каучукового та поліхлоропренового клеїв, що характеризує їх як речовини помірної подразнюючої дії; 12 [12÷13] для поліуретанового – вираженої.

Цитотоксична дія як «свіжих», так і «висушених» каучукового, поліхлоропренового, поліуретанового клеїв проявляється за умов контакту 24 год, посилюється за експозиції 72 год і характеризується різким зниженням життєздатності клітин лінії Valb/c-3T3. Клітини лінії HEK-293 виявляють більшу стійкість до токсичної дії клеєвих сполук. Випаровування розчинника у клеях знижує його токсичність за умов тривалого контакту.

Цитотоксична дія на спермії бугаїв проявляється зниженням показників енергетичного метаболізму, скороченням часу виживання статевих клітин, що зростає у послідовності: каучуковий, поліхлоропреновий та поліуретановий клеї.

Висновки. Застосування альтернативних моделей у токсикологічних дослідженнях дає змогу розширити знання механізмів ушкоджуючої дії клеєвих сполук, що використовуються у взуттєвій промисловості.

Ключові слова: взуттєві клеї, метод *in vitro*, альтернативні тест-об'єкти, цитотоксичність, безпечність.

Вступ. У сучасних біомедичних дослідженнях для прогнозування токсичності хімічних сполук, скринінгу безпеки, ранжування токсикантів тощо все більшої актуальності набуває використання методів на клітинному та молекулярному рівнях, які замінюють класичні парадигми для визначення небезпеки та оцінки ризику [2; 6; 9].

Традиційні дослідження *in vivo* часто вважаються більш інформативними, ніж *in vitro*, оскільки враховують взаємодію кількох фізіологічних шляхів, які неможливо відтворити за допомогою клітинних культур. Проте висока вартість, трудоємність експериментів, необхідність адміністративних процедур для отримання згоди комітету біоетики для експериментів на тваринах активізують застосування альтернативних тест-об'єктів *in vitro* – біологічних моделей другого порядку: найпростіших, гідробіонтів, безхребетних, ізольованих тканин, клітинних та субклітинних елементів, математичного моделювання *in silico* для комплексної оцінки токсичної дії хімічних сполук [1; 8]. Ці дані можуть бути використані під час визначення мішеней і механізмів токсичної дії та уточнення гігієнічних нормативів, розроблення засобів профілактики інтоксикацій ксенобіотиками [3].

Мета – дослідити токсичність взуттєвих клеїв за умов *in vitro* на альтернативних тест-системах.

Матеріали та методи досліджень: матеріалом для дослідження слугували клеї, які використовуються у технології виготовлення взуття: каучуковий (зразок 1), поліхлоропреновий (зразок 2) та поліуретановий (зразок 3).

In vitro-моделями, які було використано в дослідженні, слугували: а) НЕТ-САМ-тест; б) культури клітин (фібробласти миші лінії Balb/c-3T3 і ембріональні клітини нирки людини лінії НЕК-293) з клітинного банку відділу РІКА Інституту біології клітини НАН України (Львів); в) суспензійна культура клітин ссавців – сперматозоїди бугаїв.

а) Об'єктом НЕТ-САМ-тесту була хоріолантоїсна оболонка (ХАО) 9–10-денних курячих ембріонів). Як контролю використано 0,9% розчин натрію хлориду (NaCl) (негативний) та 1% розчин додецилсульфату натрію (SDS) (позитивний).

Клеї та контрольні розчини об'ємом 0,3 мл наносили на поверхню ХАО та спостерігали за реакціями та змінами через 30, 120 та 300 с за допомогою мікрокамери-ендоскопу: геморагії (крововилив із судин); лізис судин (розпад кровоносних судин); коагуляцію (внутрішньо-і позасудинну денатурацію білків) [4]. Критерії оцінки результатів представлено в табл. 1.

Таблиця 1

Критерії оцінки ефектів ХАО

Ефект / Експозиція	Бали		
	30 с	120 с	300 с
Лізис	5	3	1
Геморагії	7	5	3
Коагуляція	9	7	5

Індекс подразнення розраховували як суму балів усіх видів ефектів тестування та класифікували так: 0–0,9 – подразнювальна дія відсутня; 1–4,9 – слабка подразнювальна дія; 5–8,9 – помірна подразнювальна дія; 9–21 – виражена подразнювальна дія.

б) Клітини культивували при 37°C у зволоженій атмосфері з 5% CO₂ у середовищі Ігла в модифікації Дульбекко (DMEM, Sigma Chem. Co., США) з додаванням 10% ембріональної сироватки крові великої рогатої худоби (BPX, Sigma Chem. Co., США) і 40 мкг/мл гентаміцину (Sigma Chem. Co., США). Клітини висівали у пластикові 24 лункові планшети в концентрації 10³–10⁵ клітин/лунку. Через 24 год вносили досліджувані зразки клеїв (свіжих та висушених). Як контроль використали середовище з клітинами без додавання клею. Час дослідної експозиції становив 24 та 72 год.

Для визначення проліферативної активності в МТТ-тесті в планшет додавали барвник тетразолій блакитний 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-tetrazolium Bromide], Invitrogen™ (Sigma Chem. Co., США) у концентрації 5 мкл/мл. Інкубували 3 год за стандартних умов, відмивали 0,9% розчином NaCl та додавали в кожен лунку 50 мкл DMSO (диметилсульфоксиду; SERVA) для розчинення кристалів формазану. Оптичну густину вмісту лунок вимірювали за довжини хвилі 540 нм на багатоканальному мікрофотометрі Plate Reader BioТек 76883 (ELx800 Absorbance Reader (BioTek, USA)). Кількість живих клітин прямо пропорційно залежить від оптичної густини (екстинкції) утвореного формазану, що виражали у відсотках відносно контролю, який приймали за 100% [11].

в) Свіжоотримані еякуляти бугаїв із концентрацією сперміїв 0,8–1,2×10⁹ кл/мл об'ємом 2–5 мл розріджували лактозо-жовтковим середовищем. Розріджену частину сперми ділили на контрольні та дослідні зразки. Дослідження фізіологічних характеристик і активності окиснювальних ферментів сперміїв проводили за безпосереднього контакту клею та інкубування в атмосфері клею. На етапі безпосереднього контакту додавали 10, 20 і 40 мкл клеїв в 1 мл розрідженої сперми. Другий етап здійснювали в герметично закритому контейнері із внесенням таких доз клеїв: зразок 1 – 0,94 г; зразок 2 – 0,96 г; зразок 3 – 0,91 г. Контрольні зразки витримували за

аналогічних умов без внесення клею. Визначали: виживання спермій (год) до припинення прямолінійного-поступального руху за температури 18–22°C; активність ферментів: сукцинат-дегідрогенази (СДГ, од) і цитохромоксидази (ЦХО, од) стандартизованими методиками [5].

Результати та їх обговорення. Нанесення 0,9% NaCl на ХАО не спричинило візуальних змін упродовж усього терміну експерименту, і навпаки, нанесення 1% SDS проявилось повною запальною реакцією. Подразнюючий потенціал каучукового клею (зразок 1) проявився переважно геморагіями (30 с), у одній ХАО також і лізисом (120 с); поліхлоропренового клею (зразок 2) – лізисом (30 с) та геморагіями (30–120 с). Найінтенсивніші прояви подразнюючої дії на ХАО зафіксовані за нанесення поліуретанового клею (зразок 3): геморагії (30–120 с) і коагуляція (120–300 с).

Індекси подразнення каучукового (зразок 1) та поліхлоропренового (зразок 2) клеїв становили 7 [7÷8.5], поліуретанового (зразок 3) – 12 [12÷13], негативного контролю – 0[0÷0.5], позитивного – 15[13.5÷16] (рис. 1).

За значеннями індексів подразнення поліуретановий клей класифікується як речовина вираженої подразнюючої дії, каучуковий та поліхлоропреновий клеї – як речовини помірної подразнюючої дії.

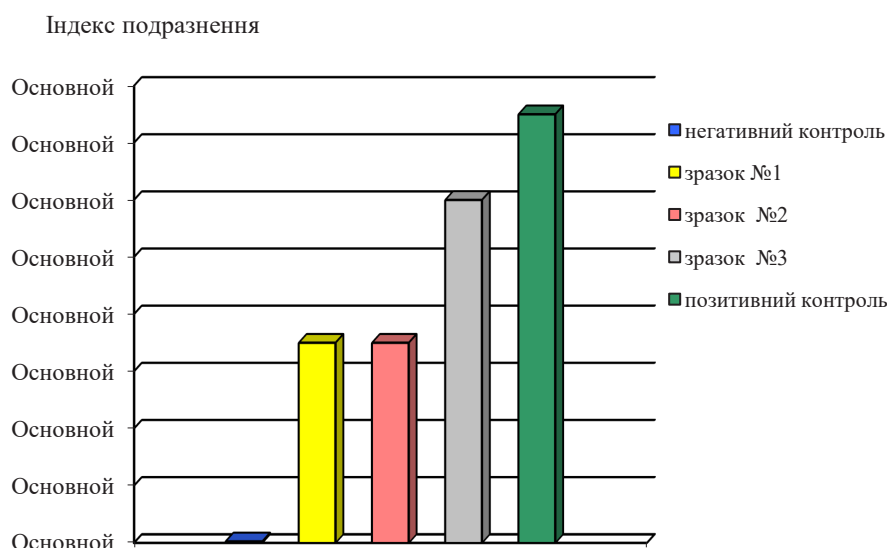


Рис. 1. Значення індексів подразнення контрольних та досліджуваних зразків клеїв

Оцінка проявів цитотоксичності підтвердила токсичність «свіжих» клеїв щодо клітин обох ліній за експозиції 24 та 72 год (рис. 2). За 24-годинного контакту кількість мертвих клітин лінії Valb/c-3T3 була незначною і становила 4,5% (зразок 2); проліферуючий вплив зразків клею 1 та 3 на ці клітини виявився недостовірним ($p > 0,05$). Кількість мертвих клітин лінії НЕК-293 за ідентичних умов контакту становила 1% (зразок 1), 4,4% (зразок 2) та 20,7% (зразок 3).

«Висушений» клей, незважаючи на те що втратив значну частину розчинника через його випаровування, характеризувався більшою ушкоджуючою дією для клітин. За 24 год контакту життєздатність клітин Valb/c-3T3 становила 77,7% (зразок 1), 74,9% (зразок 2), 71% (зразок 3); клітин НЕК-293 – 65,7% (зразок 3), для інших зразків різниця виявилася недостовірною.

Достовірно більша ($p < 0,05$) загибель клітин викликана дією «свіжих» клеїв за експозиції 72 год. Найбільший цитотоксичний ефект зафіксовано для клітин лінії Valb/c-3T3 – життєздатність клітин становила лише 23,9% (зразок 1), 19,1% (зразок 2), 21,7% (зразок 3).

Клітини лінії НЕК-293 виявилися стійкішими за ідентичних умов, їхня життєздатність становила 96,2% (зразок 1), 86,4% (зразок 2) та 68,1% (зразок 3). Цитотоксичний ефект «висуше-

них» клеїв практично не відрізнявся для культур клітин різних ліній. Життєздатність клітин лінії Balb/c-3T3 становила 93,5% (зразок 1), 70,1% (зразок 2), 67,4% (зразок 3); лінії НЕК-293 – 69,9% (зразок 1), 87,7% (зразок 2), 63,5% (зразок 3).

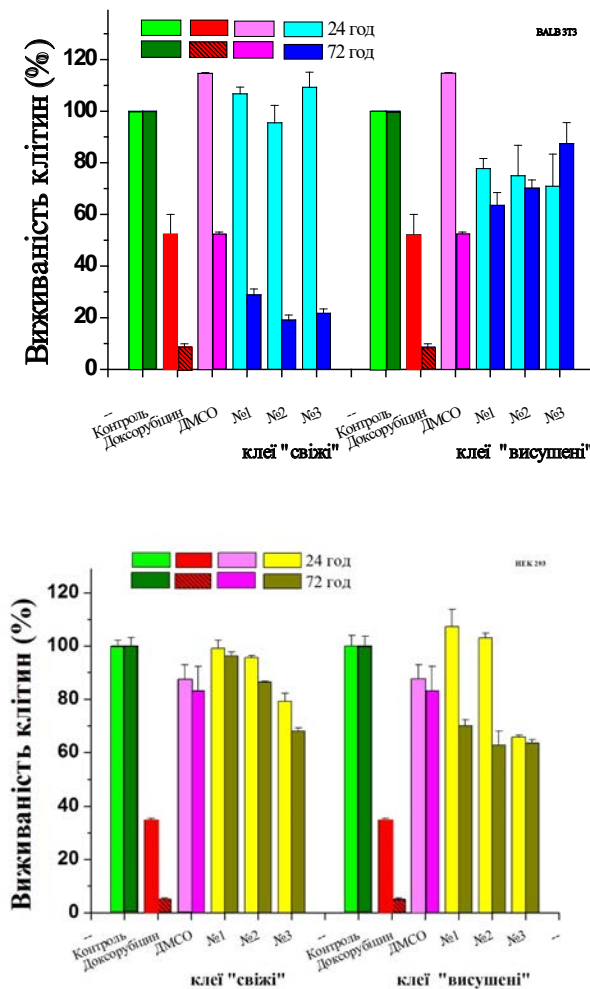


Рис. 2. Результати ММТ-тесту клітин досліджуваних ліній

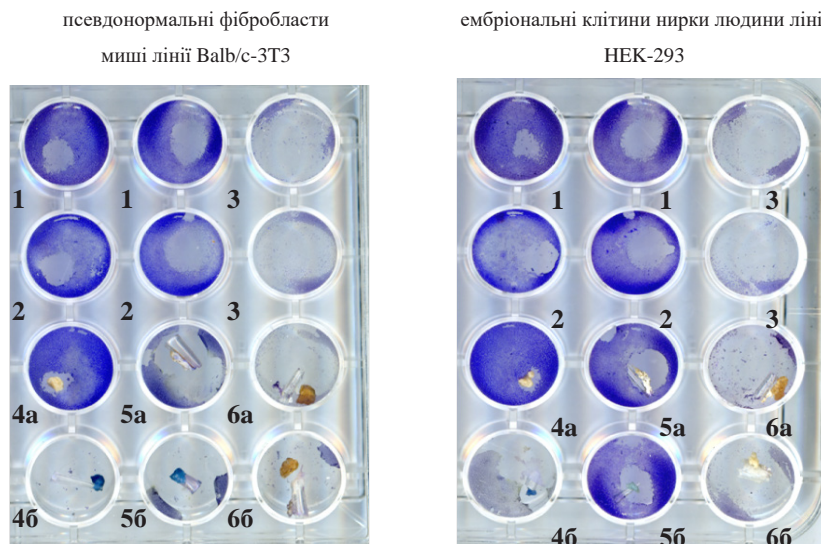
На рис. 3 представлено візуалізацію змін виживаності клітин досліджуваних ліній за умов впливу взуттєвих клеїв. Синє забарвлення відповідає зоні росту клітинної біомаси, повітління вказує на пригнічення росту, тобто цитотоксичну дію.

Ембріональні клітини нирки людини лінії НЕК-293 виявилися більш стійкими до впливу взуттєвих клеїв порівняно із псевдонормальними фібробластиами миші лінії Balb/c-3T3, що, очевидно, зумовлено більш вираженим шаром глікокаліксу.

Установлено суттєве скорочення часу виживання сперміїв за інкубування в атмосфері клею порівняно з контрольним зразком, яке становило 40–46 год, що було на 22–28 год (32,4–41,2%) нижчим порівняно з контролем (рис. 4).

Розрідження сперми повнокомпонентним середовищем із легко окислювальним субстратом – яєчним жовтком знижує час виживання статевих клітин. Це зумовлено тим, що ліпіди жовтка окислюються в атмосфері клею, утворюючи цитотоксичні продукти, що порушує ресинтез АТФ та спричиняє руйнування мембран.

Ранжування клеїв щодо їхнього впливу на терміни виживання сперміїв у напрямі скорочення було таким: поліхлоропреновий, каучуковий, поліуретановий клей.



1 – 0,9% NaCl; 2 – ДМСО; 3 – доксорубіцин; 4 – зразок № 1 (а – сухий, б – свіжий);
5 – зразок № 2 (а – сухий, б – свіжий); 6 – зразок №3 (а – сухий, б – свіжий)

Рис. 3. Якісний аналіз виживаності клітин досліджуваних ліній за впливу зразків клею, забарвлення кристалічним фіолетовим

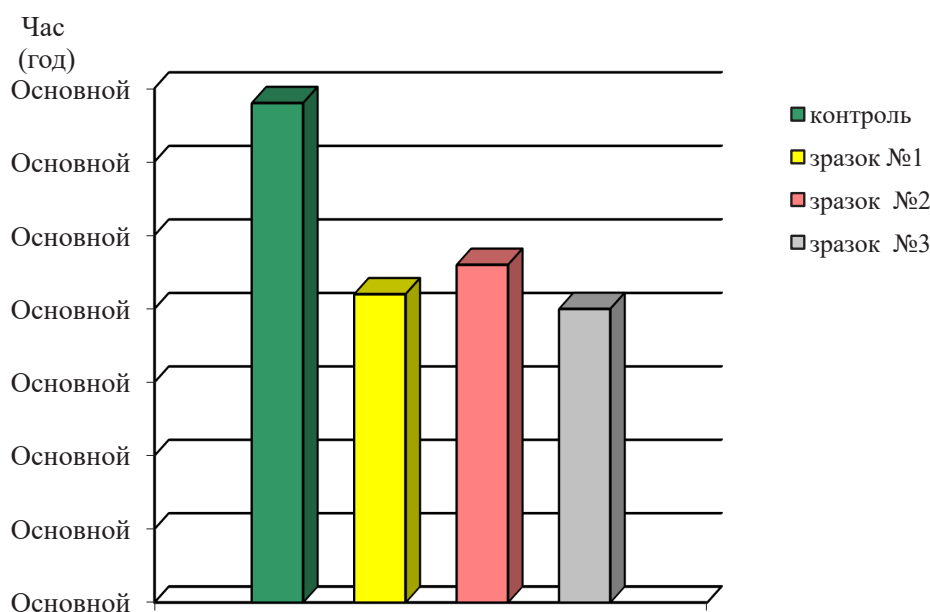


Рис. 4. Виживання сперміїв за інкубування сперми в атмосфері клею

Безпосереднє додавання клею до розрідженої лактозо-жовтковим середовищем сперми достовірно знижує виживання статевих клітин на 33,9–41,2% порівняно з контролем (рис. 5). Ця тенденція не залежить від виду клею та дози (10, 20 чи 40 мкл/мл), при цьому час виживання є практично однаковим і становить 40–45 год.

Зниження виживання сперміїв за умов додавання клею пояснюється зниженням активності мітохондріальних ензимів (рис. 6). Установлено поступове інгібування активності ферменту трикарбонних кислот СДГ, що становило 11,7→10,3→6,7 од/год×0,1 мл (зразок 1) та більш виражене 7,3→6,7 →5,7 од/год×0,1 мл (зразок 2), 6,7→6,7 →4,7 од/год×0,1 мл (зразок 3) проти 13,1 од/год×0,1 мл у контролі за умови збільшення дози клею 10, 20 та 40 мкл/мл.

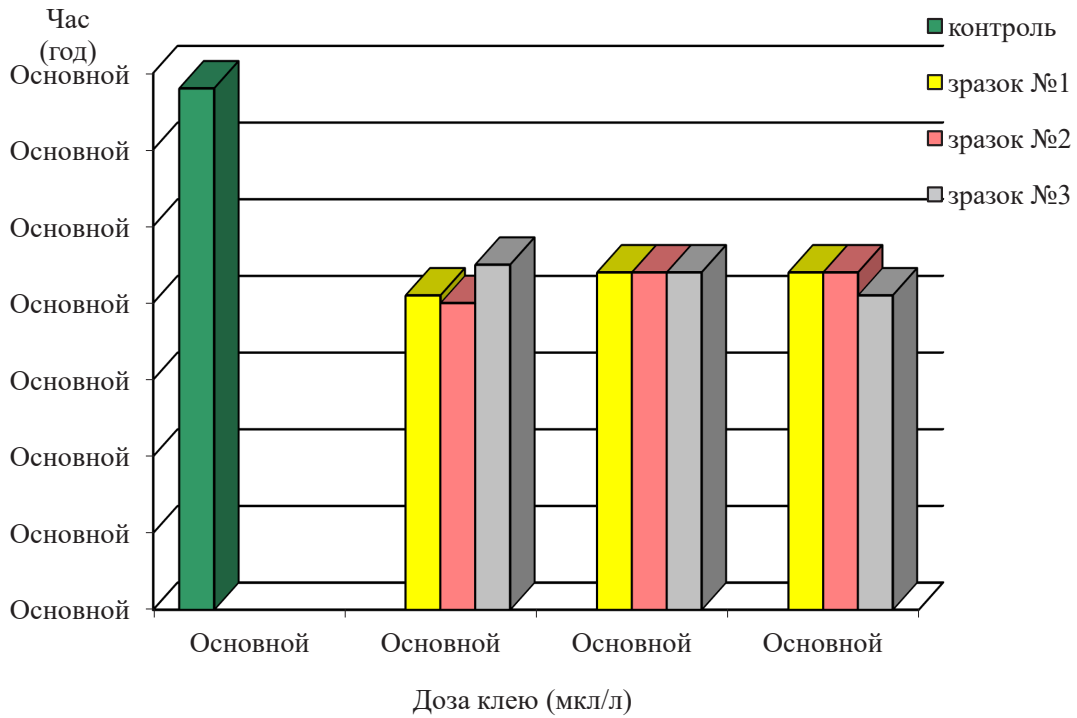


Рис. 5. Вживання спермій за інкубування в присутності клею

Дослідження активності ЦХО показало меншу різницю між її значеннями у дослідах та контролі. Додавання 10 мкл/мл зразків клею до розрідженої сперми помірно знижувало активність термінальної ланки ланцюга дихання мітохондрій спермій і становило 41,0 од/год×0,1 мл (зразок 1), 40,0 од/год×0,1 мл (зразок 2). Найменш вираженою ця різниця була для зразку клею 3 (45,0 од/год×0,1 мл) проти 48,0 од/год×0,1 мл для контролю. Збільшення доз усіх зразків клеїв (20 та 40 мкл/мл) суттєво не вплинуло на зміну активності ензиму, значення знаходилися в межах 41,0–44,0 мкл/мл.

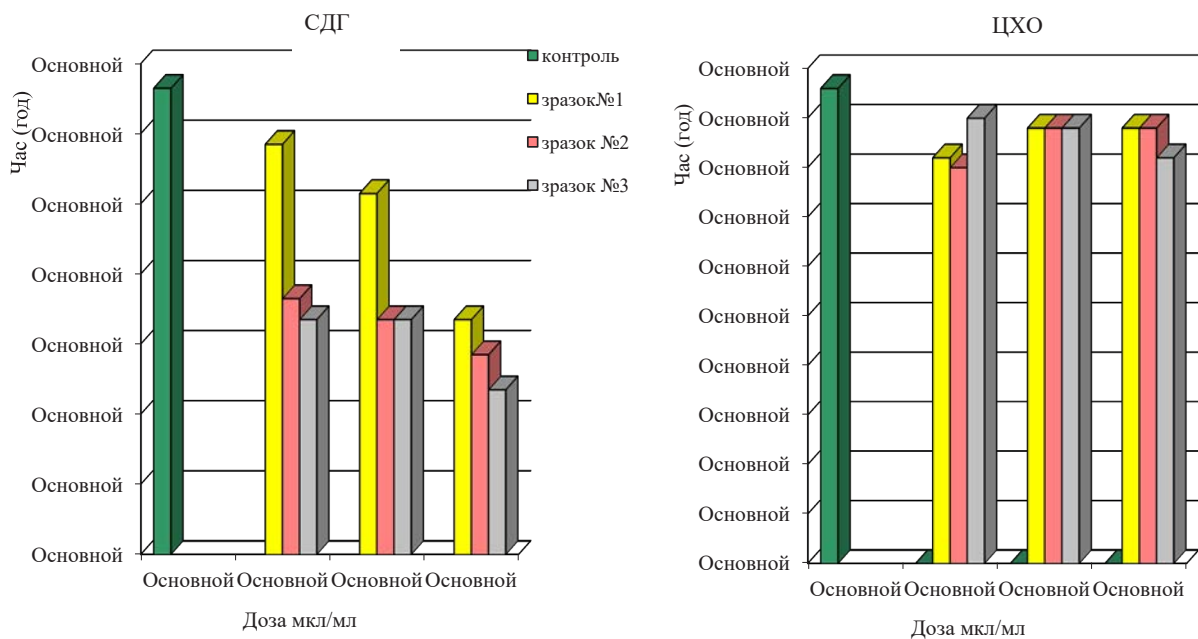


Рис. 6. Активність мітохондріальних ензимів (СДГ та ЦХО) спермій за впливу клею

Отримані результати підтверджуються роботами інших науковців [7; 10] щодо токсичного впливу взуттєвих клеїв за рахунок їхніх функціональних складників. Тому застосування біологічних скринінг-моделей є доцільним під час проведення санітарно-токсикологічної оцінки та обґрунтування потенційної небезпеки їхньої дії на організм.

Висновки.

1. Застосування альтернативних моделей у токсикологічних дослідженнях дає змогу розширити знання механізмів ушкоджуючої дії клеєвих сполук, що використовуються у взуттєвій промисловості.

2. Вивчення подразнюючої дії взуттєвих клеїв методом HET-CAM розширює спектр дослідження промислових сполук у токсикології *in vitro* та визначає інтенсивність їх іритивних проявів у діапазоні від помірного (каучуковий та поліхлоропреновий клеї) до вираженого (поліуретановий клей).

3. Цитотоксична дія як «свіжих», так і «висушених» каучукового, поліхлоропренового, поліуретанового клеїв проявляється за умов контакту 24 год, посилюється за експозиції 72 год і характеризується різким зниженням життєздатності клітин ліній Balb/c-3T3. Клітини лінії HEK-293 виявляють більшу стійкість до токсичної дії клеєвих сполук. Випаровування розчинника у клеях знижує його токсичність за умов тривалого контакту.

Цитотоксична дія взуттєвих клеїв на тест-об'єкти – спермії бугаїв проявляється зниженням показників енергетичного метаболізму, скороченням часу виживання статевих клітин, що зростає у послідовності: каучуковий, поліхлоропреновий та поліуретановий клеї.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Альтернативні методи і тест-системи : монографія / І.М. Трахтенберг та ін. Київ : Авіценна, 2008. 272 с.
2. Дмитруха Н.М. Застосування альтернативних тест-моделей *in vitro* для оцінки токсичності сполук важких металів. *Актуальні проблеми профілактичної медицини*. 2023. Вип. 26. С. 27–36. doi: 10.32782/2786-9067-2023-26-3.
3. Зауляк Т.С. Теоретичні та прикладні аспекти застосування альтернативних методів дослідження токсичності при здійсненні гігієнічної регламентації хімічних чинників виробництва. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2019. № 4(88). С. 73–89. doi: 10.25040/escrb2019.04.073.
4. Кузьмінов Б.П., Туркіна В.А., Чемодурова Н.Є. Оцінка подразнювальної дії хімічних речовин на хоріоалантоїсній оболонці курячого ембріону (test HET-CAM): методичні вказівки. Львів, 2023. 20 с.
5. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині : довідник / за ред. В.В. Влізло. Львів : Сполом, 2012. 764 с.
6. Gan J., Bolon B., Van Vleet T., Wood Ch. Chapter 24 – Alternative models in biomedical research: *in silico*, *in vitro*, *ex vivo*, and nontraditional *in vivo* approaches. *Handbook of Toxicologic Pathology (Fourth Edition)*. Academic Press, 2022. P. 925–966. doi: 10.1016/B978-0-12-821044-4.00005-4.
7. Lukács J., Präßler J., Gebhardt M., Elsner P. Adhesives and Glues. *Kanerva's Occupational Dermatology*. Springer, 2020. P. 891–900. doi: 10.1007/978-3-319-68617-2_59.
8. Maestri E. The 3Rs principle in animal experimentation: A legal review of the state of the art in Europe and the case in Italy. *BioTech (Basel)*. 2021. № 10(2). P. 9–14. doi: 10.3390/biotech10020009.
9. McMullen P.D., Andersen M.E., Cholewa B., Harvey J. et al. Evaluating opportunities for advancing the use of alternative methods in risk assessment through the development of fit-for-purpose *in vitro* assays. *Toxicology in Vitro*, 2018. Vol. 48. P. 310–317. doi: 10.1016/j.tiv.2018.01.027.
10. Orgiles-Calpena M.E., Aran-Ais F., Torro-Palau A.M., et al. Adhesives in the footwear industry: a critical review. *Rev. Adhesion Adhesives*, 2019. №7(1). P. 69–91. doi: 10.7569/RAA.2019.097303.
11. Tolosa L., Donato M.T., Gómez-Lechón M.J. General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay. *Methods Mol Biol*, 2015. № 1250. P. 333–348. doi: 10.1007/978-1-4939-2074-7_26.

REFERENCES

1. Trakhtenberh, I.M. (2008). Al'ternatyvni metody i test-systemy: monohrafiya [Alternative methods and test systems; monograph], Kyiv: Avitsena [in Ukrainian].
2. Dmytrukha, N.M. (2023). Zastosuvannya al'ternatyvnykh test-modeley in vitro dlya otsinky toksychnosti spoluk vazhkykh metaliv [Application of alternative in vitro test models for assessing the toxicity of heavy metal compounds]. *Aktual'ni problemy profilaktychnoyi medytsyny – Actual problems of preventive medicine*, 26, 27–36 [in Ukrainian].
3. Zazulyak, T.S. (2019). Teoretychni ta prykladni aspekty zastosuvannya al'ternatyvnykh metodiv doslidzhennya toksychnosti pry zdiysnenni hihiyenichnoyi rehlementatsiyi vyrobnytstva khimichnykh chynnykiv [Theoretical and applied aspects of the application of alternative methods of toxicity research in the implementation of hygienic regulation of chemical factors of production]. *Eksperymental'na ta klinichna fiziolohiya i biokhimiya - Experimental and clinical physiology and biochemistry*, 88(4), 73–81 [in Ukrainian].
4. Kuzminov, B.P., Turkina, V.A., & Chemodurova, N.Ye. (2023). Otsinka podraznyval'noyi diyi khimichnykh rehovyn na khorioalantoyisniy obolontsi kuryachoho embrionu (test HET-CAM): metodychni vkazivky [Methodological guidelines. Evaluation of irritation action of substances on the chorioallantoic membrane of the chick embryo (HET-CAM test)], Lviv [in Ukrainian].
5. Vlizlo, V.V. (2012). Laboratorni metody doslidzhen' u biolohiyi, tvarynnytsvtvi ta veterynarniy medytsyni: dovidnyk [Laboratory research methods in biology, animal husbandry and veterinary medicine], L'viv, Spolom [in Ukrainian].
6. Gan, J., Bolon, B., Van Vleet, T., & Wood, C. (2022). Alternative models in biomedical research: In silico, in vitro, ex vivo, and nontraditional in vivo approaches. In *Haschek and Rousseaux's handbook of toxicologic pathology*, Academic Press.
7. John, S.M., Johansen, J.D., Rustemeyer, T., Elsner, P., & Maibach, H.I. (2019). *Kanerva's occupational dermatology*. Springer International Publishing, 891–900.
8. Maestri, E. (2021). The 3Rs principle in animal experimentation: A legal review of the state of the art in Europe and the case in Italy. *BioTech*, 10(2), 9–14.
9. McMullen, P.D., Andersen, M.E., Cholewa, B., Clewell III, H.J., Dunnick, K.M., Hartman, J.K., et al. (2018). Evaluating opportunities for advancing the use of alternative methods in risk assessment through the development of fit-for-purpose in vitro assays. *Toxicology in Vitro*, 48, 310–317.
10. Orgilés-Calpena, E., Arán-Aís, F., Torró-Palau, A.M., & Sánchez, M.A. (2019). Adhesives in the footwear industry: a critical review. *Reviews of adhesion and adhesives*, 7(1), 69–91.
11. Tolosa, L., Donato, M.T., & Gómez-Lechón, M.J. (2015). General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. *Protocols in in vitro hepatocyte research*, 1250, 333–348.

THE ROLE OF IN VITRO STUDIES FOR ASSESSING THE POTENTIAL RISKS OF INDUSTRIAL TOXICANTS (EXAMPLE OF SHOE GLUES)

Lototska-Dudyk U.B.

Abstract. In modern biomedical research, the use of methods at the cellular and molecular levels, which replace the classical paradigms for hazard determination and risk assessment, is becoming increasingly relevant for predicting the toxicity of chemical compounds.

The aim of the work was to investigate the toxicity of shoe glues under in vitro conditions on alternative test systems.

Materials and methods: studied glues used in footwear manufacturing technology: rubber, polychloroprene, and polyurethane.

In vitro methods were HET-CAM test, evaluation of cytotoxicity in cell cultures (mouse fibroblasts of the Balb/c-3T3 line and human embryonic kidney cells of the HEK-293 line) and on the suspension culture of bull spermatozoa.

Results: according to the totality of vascular reactions of the chorioallantoic membrane (hemorrhages, lysis and coagulation), the irritation indices were 7[7÷8.5] for rubber and polychloroprene glues, which characterizes them as substances of moderate irritating effect; 12[12÷13] for polyurethane - expressed.

The cytotoxic effect of both "fresh" and "dried" rubber, polychloroprene, polyurethane glues is manifested under contact conditions of 24 hours, increases after exposure for 72 hours. and is characterized by a sharp decrease in the viability of Balb/c-3T3 cells. Cells of the HEK-293 line show greater resistance to the toxic effect of adhesive compounds. Evaporation of the solvent in adhesives reduces its toxicity under conditions of long-term contact.

The cytotoxic effect on the sperm of bulls is manifested by a decrease in indicators of energy metabolism, a reduction in the survival time of germ cells, which increases the sequence of rubber, polychloroprene and polyurethane glues.

Conclusions: The use of alternative models in toxicological studies makes it possible to expand the knowledge of the mechanisms of the harmful effect of adhesive compounds used in the shoe industry.

Key words: shoe glues, in vitro method, alternative test objects, cytotoxicity, safety.

Лотоцька-Дудик Уляна Богданівна <https://orcid.org/0000-0001-7587-8457>

Надійшла до редакції / Receiv: 24.06.2024