

<https://doi.org/10.32782/2786-9067-2023-26-3>

УДК 615.9 : 577.1 : 57.085.2

ЗАСТОСУВАННЯ АЛЬТЕРНАТИВНИХ ТЕСТ-МОДЕЛЕЙ IN VITRO ДЛЯ ОЦІНКИ ТОКСИЧНОСТІ СПОЛУК ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

Дмитруха Н.М.

ДУ «Інститут медицини праці імені Ю.І. Кундієва НАМН», Київ, Україна

Анотація. На сьогодні в токсикології для оцінки безпеки хімічних речовин поряд із традиційними експериментами на теплокровних тваринах значного поширення набуло використання альтернативних тест-моделей in vitro. Серед існуючих найбільш поширеними є культура клітин. Тестування на клітинах надає інформацію про потенційну цитотоксичну дію, а також дозволяє вивчати механізми впливу на різні органи і тканини. Також у якості альтернативних моделей можуть бути використані такі об'єкти, як білки, нуклеїнові кислоти.

Проведено оцінку токсичності сполук важких металів на культурі клітин та білків плазми крові людини in vitro. Встановлено, що найбільш чутливими до токсичного впливу солей важких металів були клітини печінки і легень, а найменш вразливими виявились клітини шкіри та лімфоцити. Досліджено, що сполуки металів викликали суттєві конформаційні зміни білків крові. Найбільш виразну денатуруючу дію на білки чинив ацетат свинцю в усіх досліджуваних концентраціях. Цитотоксичність металів спадала в ряду $Hg > Cd > Pb > Mn$, а денатуруюча активність у послідовності $Pb > Hg > Cd > Mn$. За результатами дослідження розраховано концентрацію сполуки металу (LC_{50}), яка викликала 50 % загибель клітин по відношенню до контролю.

Ключові слова: *культура клітин, білки крові, важкі метали, токсичність in vitro.*

Вступ. Оцінка токсикологічних ефектів та потенційних ризиків хімічних речовин є важливим етапом при їх розробці та реєстрації. Токсикологічні дослідження спрямовані на встановлення системних та специфічних токсичних ефектів речовини, а також їх наслідків.

Використання теплокровних тварин у токсикологічних дослідженнях є традиційним і загально визнаним підходом і сьогодні продовжують залишатися необхідними для оцінки ступеня та механізмів токсичності нових і існуючих хімічних речовин, їх сполук, а також пошуку засобів профілактики негативного впливу на здоров'я людини. Проте, досліди in vivo нерідко є такими, що травмують тварин, особливо при моделюванні гострих інтоксикацій, а також призводять до їх загибелі. Недоліком класичних токсикологічних досліджень також є те, що вони потребують багато часу, є коштовними та трудозатратними. Тому в сучасній токсикології при оцінці безпеки нових хімічних речовин та їх сполук поряд із традиційними

експериментами на лабораторних тваринах значного поширення набуло використання альтернативних тест-об'єктів та методів *in vitro* [1,2].

Термін «альтернатива» в контексті даного питання означає «об'єкти та методи», які можуть максимально замінити потреби, зокрема у використанні тварин, зменшити їх кількість і підвищити якість результатів токсикологічного експерименту. Дана концепція альтернативи включає всі три основні положення (*Reduction, Replacement, Refinement*), запропоновані дослідниками W. Russel і R. Birch (1959) і названі принципом «Three Rs» («Трьох Р») [3]. Цей принцип став загальновизнаним світовим стандартом експериментальної роботи з тваринами і широко використовується на сучасному етапі при проведенні токсикологічних досліджень. *Reduction* (скорочення) означає застосування методичних підходів, які дають можливість одержувати інформацію при використанні меншого числа тварин. *Replacement* (заміна) означає виключення тварин з експерименту або навчального процесу, якщо є можливість отримати аналогічні результати альтернативними методами. *Refinement* (удосконалення) – удосконалення експериментальних методик для зниження або виключення негативного впливу на тварину, мінімізація страждань і стресу [3].

Слід відзначити, що у продовж 50 років принцип «Three Rs» був кодифікований у закони, стандарти й керівні документи в усьому світі. Завдяки цій концепції вченим вдалося сконцентрувати увагу на даній проблемі урядів і академічних центрів багатьох країн, що призвело до істотної зміни техніки досліджень, випробувань і навчання з користю як для науки, здоров'я суспільства й освіти, так і в інтересах захисту експериментальних тварин. Співтовариством науковців було прийнято відповідну угоду «Європейська конвенція щодо захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та іншою науковою метою» від 18 березня 1986 року [4].

На сьогодні в якості альтернативних *in vitro* моделей для дослідження токсичності ксенобіотиків використовуються системи різної біологічної організації – безхребетні тварини, гідробіонти, мікроорганізми, рослини, культури клітин людини та тварин, фізико-хімічні тест-системи. На цих простих моделях досліджуються рухливість, хемотаксис, метаболічна активність, інтенсивність розмноження біологічних об'єктів, які використовують як показники ступеню токсичності досліджуваних речовин. Вибір моделі залежить від особливостей будови молекули або групи речовин, що досліджуються, а також від мети досліджень [5,6].

За результатами виконаних чисельних досліджень, тест-моделі та методи *in vitro* добре відтворюються, у тому числі в міжлабораторних умовах, придатні для практичної мети. Було показано, що вони є досить точними, простими, швидкими у постановці, перспективними,

універсальними, практично цінними, селективними та рентабельними. Позитивними сторонами також відзначена їх економічність, високий ступінь відтворюваності результатів і оперативність в одержанні інформації. Вони дають надійні результати, дозволяють проводити кінетичний аналіз, кількісну оцінку, вивчати залежності “доза – ефект” та “структура – активність”. Тести *in vitro* можна автоматизувати й проводити у мікрокількостях. Дозу досліджуваної речовини можна вимірювати та контролювати з досить високою точністю, а це полегшує встановлення токсичної концентрації ксенобіотика [5].

Всесвітня організація охорони здоров'я, міжнародне медико-біологічне товариство не тільки схвалюють, але й настійно рекомендують і підтримують використання альтернативних моделей в сучасних токсикологічних дослідженнях [7,8]. Впровадження альтернативних методів в токсикологічні дослідження відбувається під контролем таких організацій, як Європейський центр по затвердженню альтернативних методів (ECVAM), Інтернаціональний комітет центру по затвердженню альтернативних методів (ICCVAM), Європейське співтовариство токсикологів *in vitro* та інших (ISTIV) [9]. Тестування в умовах *in vitro* включені до переліку обов'язкових методів оцінки потенційної небезпечності хімічних речовин для здоров'я людини і навколишнього середовища з метою наступної їхньої реєстрації, експертизи та авторизації за правилами нового Європейського законодавства (REACH), яке набуло чинності з 2007 року [10].

Серед існуючих тест-моделей найпоширенішими в токсикологічних дослідженнях *in vitro* визнані культури клітин. Тестування на клітинних лініях надає інформацію про потенційну цитотоксичну дію. Метод культур клітин дозволяє обрати найбільш адекватний об'єкт для дослідження та ізольовано вивчати специфіку впливу речовини на клітини різних органів і тканин (гепатоцити, клітини крові, сполучна тканина, нервова система, нирки тощо) і таким чином дослідити гепато-, нейро-, нефро-, імунотоксичність та інші ефекти їх токсичної дії на організм. Загальна цитотоксичність, як несприятлива дія на структуру і властивості клітин, оцінюється за їхньою здатністю до виживання, проліферації і функціонування. На клітинному рівні можна виділити три основні механізми цитотоксичної дії - це пошкодження клітинних мембран, порушення процесів метаболізму; порушення регуляції поділу клітин. За результатами вищевказаних тестів визначають концентрацію досліджуваної речовини, яка викликає 50 % зниження того чи іншого показника по відношенню до контролю і позначається як концентрація, що викликає пригнічення росту 50% клітин (IC_{50}), або ефективна концентрація, що викликає порушення функції у 50% клітин (EC_{50}) або середньолетальна концентрація, що викликає загибель 50% клітин (LC_{50}) [7, 11].

До альтернативних тест-об'єктів відносяться молекулярні структури такі, зокрема білки, що належать до класу природних полімерів, для яких встановлено зв'язок між структурою і функціональними властивостями макромолекул. У природних умовах білки мають кілька термодинамічно вигідних конформаційних наливних (природних) станів. Для позначення процесу, при якому нативна структура білка втрачається, використовують термін - денатурація. Денатурація супроводжується зниженням гідрофільності білкових молекул, зменшенням стабільності їх розчинів в ізоелектричній точці, підвищенням реакційної здатності функціональних груп молекули (-SH, -COOH, -NO₂, фенольних та інших) і супроводжується конформаційними змінами - руйнуванням четвертинної, третинної, а іноді і вторинної структури білкової молекули, що визначається чіткою зміною спектрів поглинання [12].

Мета дослідження – оцінка токсичності сполук важких металів на культуру клітин та білків плазми крові людини *in vitro*.

Матеріали та методи дослідження. Об'єктом дослідження були сполуки важких металів (хлорид ртуті, сульфат кадмію, сульфат марганцю, ацетат свинцю). У якості альтернативних тест-об'єктів *in vitro* використовували культури клітин людини різних ліній та білки плазми крові людини. Культури клітин були отримані з Банку клітинних ліній Інституту експериментальної патології, онкології і радіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

Цитотоксичну дію сполук важких металів визначали по відношенню до культури клітин ліній: A-549 (аденокарциноми легенів), Hep-G2 (гепатокарциноми), HaCat (нормальні кератиноцити), МТ-4 (Т-клітинної лейкемії) та Raji (лімфоми Беркітта) в тесті з метилтетразолієм (МТТ-тест). За результатами дослідження розраховували концентрацію речовини (LC₅₀), яка викликає 50 % загибель клітин чи зниження цього показника по відношенню до контролю [13]. У подальшому дані LC₅₀ були порівняні з показниками LD₅₀, встановленими для щурів.

Дослідження конформаційних змін білків крові людини – альбуміну та імуноглобулін G (Sigma, США) після впливу сполук важких металів проводили шляхом вимірювання оптичної щільності дослідного розчину по відношенню до позитивного контролю (0,1 Н розчин HCl) на ІФА рідері Sunrise Tecan (Австрія) при довжині хвилі 450 нм [14].

Для обрахунку цитотоксичних концентрацій використовували пробіт-аналіз за допомогою статистичної програми STATISTICA 6 .

Результати дослідження та їх обговорення

Результати оцінки цитотоксичної дії солей важких металів показали, що найбільш токсичною сполукою для клітин легенів (лінія A-549) був хлорид ртуті LC₅₀= 0,02 мг/мл, потім сульфат кадмію LC₅₀= 0,03 мг/мл, ацетат свинцю LC₅₀= 0,17 мг/мл і завершував цей

ряд сульфат марганцю $LC_{50}=0,40$ мг/мл. Для клітин печінки (лінія Нер-G2) найбільш токсичними були хлорид ртуті і сульфат кадмію $LC_{50}=0,01$ мг/мл, для ацетату свинцю $LC_{50}=0,20$ мг/мл, а марганцю сульфату $LC_{50}=0,50$ мг/мл. Для клітин шкіри лінії HaCat (нормальні кератиноцити) серед досліджуваних сполук важких металів найбільшу цитотоксичну дію чинив сульфат кадмію ($LC_{50}=0,03$ мг/мл) та хлорид ртуті $LC_{50}=0,05$ мг/мл, потім ацетат свинцю $LC_{50}=0,20$ мг/мл і сульфат марганцю $LC_{50}=0,75$ мг/мл. Для клітин лінії MT4 (Т-лімфоцити) найбільшу цитотоксичну активність встановлено для сульфату кадмію $LC_{50}=0,01$ мг/мл та хлориду ртуті ($LC_{50}=0,02$ мг/мл), потім ацетат свинцю ($LC_{50}=0,33$ мг/мл), найменшу токсичну дію на Т-лімфоцити чинив сульфат марганцю ($LC_{50}=0,55$ мг/мл). По відношенню до клітин Raji (В-лімфоцити) більш токсичними виявились хлорид ртуті ($LC_{50}=0,01$ мг/мл) та сульфат кадмію ($LC_{50}=0,03$ мг/мл), тоді як ацетат свинцю і сульфат марганцю були менш токсичними ($LC_{50}=0,30$ мг/мл і $LC_{50}=0,66$ мг/мл) (рис.1).

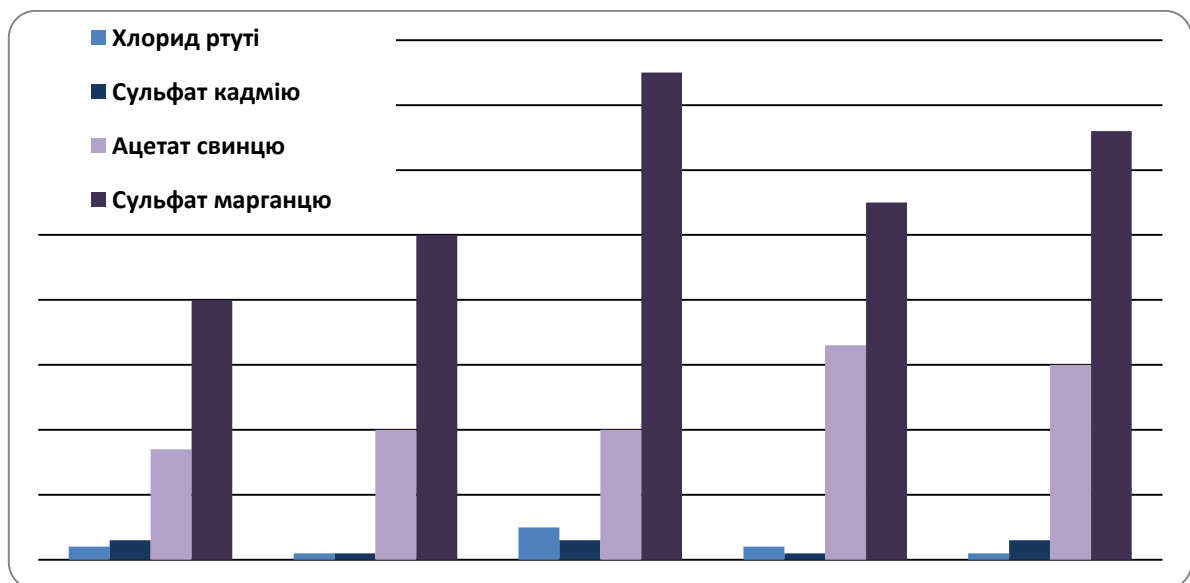


Рис.1. - Значення концентрації для солей важких металів (LC_{50}), що викликала 50% загибель клітин у культурі (дані МТТ-тесту).

Отримані результати дозволяють дійти висновку, що найбільш чутливими до токсичного впливу солей металів були клітини печінки і легень, а найменш вразливими виявились лімфоцити та клітини шкіри. Цитотоксична дія сполук металів мала залежність “доза – ефект” та “структура – активність”, спадала в ряду $Hg > Cd > Pb > Mn$.

Порівняння показників цитотоксичності (LC_{50}) для солей металів з величинами LD_{50} , визначеними в експерименті для щурів і водних організмів свідчить, що значення LC_{50} для клітин *in vitro* відповідають показнику LD_{50} для щурів при інгаляційному чи внутрішньо очеревиному введенні з коефіцієнтом =1000 (табл.).

Дослідження на білках плазми крові людини дозволили встановити, що додавання солей важких металів до розчинів білків в умовах *in vitro* викликало зміни їх оптичної щільності, що вказує на порушення структури (денатурацію) білка [14,15]. Серед досліджуваних солей важких металів найбільш виразну денатуруючу дію на альбумін сироватки крові людини справляв ацетат свинцю (у всіх концентраціях). Сульфат кадмію викликав суттєву денатурацію альбуміну у дозі 0,1 моль/л.

Таблиця

Показники LC₅₀ і LD₅₀ солей металів

Соли металів	Середнє LC ₅₀ для клітин, мг/мл	Значення LD ₅₀		
		Щурі, мг/кг	Риби, мг/л	Daphnia magna мг/л
Хлорид ртуті	0,022	67,0 (орально) 15,0 (шкіра) 21,4 (в очеревину)	748,0	0,002
Сульфат кадмію	0,022	107,0 (орально) 40,0 (в очеревину)	0,75	0,036
Ацетат свинцю	0,240	4665 (орально) 265,0 (в очеревину)	0,107	0,073
Сульфат марганцю	0,572	2150 (орально) 445 (інгаляція) 485,0 (в очеревину)	61,0	30,0

Після додавання хлориду ртуті до розчину альбуміну зміни даного білка були незначними, найбільші показники оптичної густини були встановлені при концентрації солі 0,1 моль/л. Сульфат марганцю після додавання до розчину альбуміну не викликав зміни оптичної щільності розчину даного білку навіть у високих концентраціях. Дослідження впливу солей важких металів на імуноглобулін людини виявили аналогічні зміни. Отже, встановлено, що досліджувані сполуки металів викликали суттєві конформаційні зміни білків у послідовності Pb>Hg>Cd>Mn (рис.2).

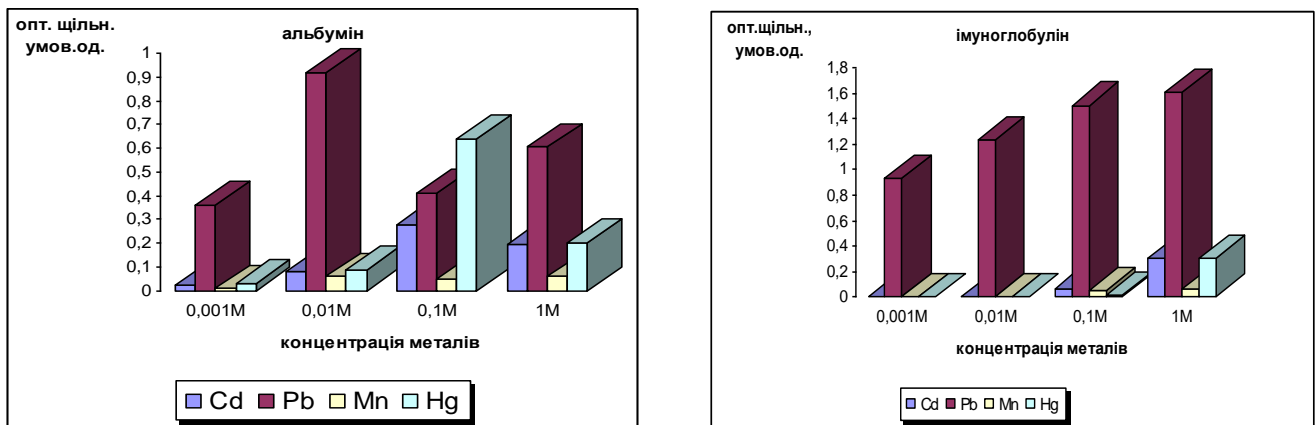


Рис. 2 - Зміни оптичної щільності розчинів білків після 2-х годин інкубації з розчинами солей важких металів у діапазоні концентрацій (0,001 М - 1,0 М) в умовах *in vitro*.

Отримані результати щодо оцінки токсичності солей важких металів на альтернативних тест-моделях *in vitro* дозволяють дійти наступних висновків.

Висновки та перспективи

1. Дослідження на культурі клітин *in vitro* дозволяють вивчити цитотоксичну дію речовини, з'ясувати її механізми. Дозу досліджуваної речовини, що отримується кожною клітиною, можна вимірювати та контролювати з досить високою точністю, що полегшує встановлення летальної концентрації (LC_{50}).
2. Використання клітин людини дає можливість екстраполювати отримані дані безпосередньо на організм людини та визначати потенційні органі-мішені токсичного впливу.
3. Дослідження на білках плазми крові людини, що виконують різні функції, дає можливість визначити особливості транспорту, накопичення та розподілення металів в організмі.
4. Дослідження токсичності ксенобіотиків на альтернативних моделях *in vitro* дозволяють провести експрес-оцінку їх гострої токсичності та визначити показник LC_{50} ; на його основі встановити орієнтовне значення LD_{50} , а також вивчати залежності “доза – ефект” та “структура – активність”.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. ATLA Alternatives to laboratory Animals // Third World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences. 29 August – 2 September, 1999. Bologna, Italy, Urecht, Programme and Abstracts. 442 p.
2. Альтернативні методи і тест-системи. Лікарська токсикологія / Трахтенберг І.М., Коваленко В.М., Кокшарьова Н.В., Жмінко П.Г. та ін.: за редакцією акад. АМН України І.М. Трахтенберга. – К.:Авіцена, 2008. 272 с.

3. Schuppli C.A., Fraser D. The interpretation and application of the three Rs by animal ethics committee members. *ATLA*. 2005. Vol.33, No 5. P.487-500.
4. Коршун М.Н., Краснокутская Л.М. Принцип "Трех R" и пути его реализации в токсиколого-гигиенических исследованиях. *Український журнал з проблем медицини праці*. 2005. № 3-4. С. 66-74.
5. Holme J.A., Dybing E. The use of in vitro methods for hazard characterisation of chemicals. *Toxicology Lett*. 2002. Vol. 127. No 1-3. P.136-141.
6. Combes R.D. The Use of Human Cells in Biomedical Research and Testing. *Altern. Lab. Anim*. 2004. № 32. P.43-49. DOI : <https://doi.org/10.1177/026119290403201s08>
7. Hartung T., Gstrauntheler G., Coecke S. et al. Good Cell Culture Practice (GCCP)— an Initiative for Standardization and Quality Control of in Vitro Studies. The Establishment of an ECVAM. Task Force on GCCP. *ALTEX*. 2001. No 1 (18). P. 75 – 78.
8. OECD № 14 The Application of the Principles of GLP to in vitro Studies. Advisory Document of the Working Group on GLP. – Paris: Organization for Economic Co-operation and Development, 2004. 18 p.
9. ICCVAM (2001) Report of the International Workshop on In Vitro Methods for Assessing Acute systemic Toxicity. ICCVAM-NICEATM workshop, Arlington, VA, USA., 2000. NIH Publication N. 01-4499. 370 p.
10. Council Regulation (EC) No. 440/2008 "Establishing testing methods in accordance with Regulation (EC) No. 1907/2006 of the European Parliament and Council on the Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals and Preparations (REACH)" dated May 30, 2008.
11. Дмитруха Н.Н. Культура клеток как in vitro модель в токсикологических исследованиях. *Медікс–Антиейджинг*. 2013. № 3 (33). С. 50–55.
12. Schuppe-Koistinen I. Molecular profiling and prediction of toxicity. *ATLA*. 2001. Vol. 29, No.3. P.287-289.
13. Scudiero D.A., Shoemaker R.H., Paull K.D. et al. Evaluation of a soluble tetrasolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res*. 1988. Vol. 48 (17). P. 4827-4833.
14. Прокопенко В.В., Набока Ю.Н., Метелица Л.А. и др. Чувствительность молекулярных, надмолекулярных и клеточных биообъектов к катионам тяжелых металлов. *Современные проблемы токсикологии*. 1999. № 3. С. 18-21.
15. Дмитруха Н.М., Лагутіна О.С., Громовий Т.Ю., Пилипчук Є.В. Дослідження безпечності нанопрепаратів заліза і міді за їхнім впливом на білки плазми крові людини в умовах in vitro. *Український журнал з проблем медицини праці*. 2021. Том.17. № 3. С.139-

150.

REFERENCES

1. ATLA Alternatives to laboratory Animals (1999). Third World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences. 29 August – 2 September, 1999. Bologna, Italy, Urecht, Programme and Abstracts. 442 p.
2. Trakhtenberh IM, Kovalenko VM, Koksharova NV, Zhminko PH. ta in. Alternatyvni metody i test-systemy. Likarska toksykologhiia.: za redaktsiieiu akad. AMN Ukrainy I.M. Trakhtenberha. – K.:Avitsena, 2008. 272 p.
3. Schuppli CA, Fraser D. The interpretation and application of the three Rs by animal ethics committee members. ATLA; 2005;33:5: 487-500.
4. Korshun MN, Krasnokutskaiia LM. Pryntsyp "Treh R" y puty eho realizatsyy v toksykologohyhyenycheskykh yssledovanyiakh. Ukrainskyi zhurnal z problem medytsyny pratsi. 2005;3,4:66-74.
5. Holme JA., Dybing E. The use of in vitro methods for hazard characterisation of chemicals. Toxicology Letter. 2002;127:1-3:136-141.
6. Combes RD. The Use of Human Cells in Biomedical Research and Testing. Altern. Lab. Anim. 2004;32:43-49. DOI : <https://doi.org/10.1177/026119290403201s08>.
7. Hartung T, Gstrauntheler G, Coecke S. et al. Good Cell Culture Practice (GCCP) — an Initiative for Standardization and Quality Control of in Vitro Studies. The Establishment of an ECVAM. Task Force on GCCP. ALTEX. 2001;1(18):75–78.
8. OECD № 14 The Application of the Principles of GLP to in vitro Studies. Advisory Document of the Working Group on GLP. – Paris: Organization for Economic Co-operation and Development. 2004;18.
9. ICCVAM Report of the International Workshop on In Vitro Methods for Assessing Acute systemic Toxicity. ICCVAM-NICEATM workshop, Arlington, VA, USA.; 2000. NIH Publication N. 01-4499. 370 p.
10. Council Regulation (EC) No. 440/2008 "Establishing testing methods in accordance with Regulation (EC) No. 1907/2006 of the European Parliament and Council on the Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals and Preparations (REACH)" dated May 30, 2008.
11. Dmytrukha NN. Kultura kletok kak in vitro model v toksykologhycheskykh yssledovanyiakh. Mediks–Antyeidzhynh. 2013;3(33):50–55.
12. Schuppe-Koistinen I. Molecular profiling and prediction of toxicity. ATLA. 2001;29:3: 287-289.
13. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD. et al. Evaluation of a soluble tetrasolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res.; 1988;48(17):4827-4833.

14. Prokopenko VV, Naboka YuN, Metelytsa LA. et al. Chuvstvitelnost molekuliarnykh, nadmolekuliarnykh kletochnykh byoоектов k kationam tiazhelykh metallov. Sovremennye problemy toksykologhii. 1999;3:18-21.

15. Dmytrukha NM, Lahutina OS, Hromovyi TIu, Pylypchuk YeV. Doslidzhennia bezpechnosti nanopreparativ zaliza i midi za yikhnim vplyvom na bilky plazmy krovi liudyny v umovakh in vitro. Ukrainskyi zhurnal z problem medytsyny pratsi. 2021;17:3:139-150.

APPLICATION OF ALTERNATIVE IN VITRO TEST MODELS FOR ASSESSING THE TOXICITY OF HEAVY METAL COMPOUNDS

Dmytrukha N.M.

Abstract. Today, in toxicology, the use of alternative in vitro test models, along with traditional experiments on warm-blooded animals, has become widely used to assess the safety of chemical substances. Among the existing ones, cell culture is the most common. Testing on cells provides information about the potential cytotoxic effect, and also allows studying the mechanisms of influence on various organs and tissues. Objects such as proteins and nucleic acids can also be used as alternative models. The toxicity of heavy metal compounds on cell culture and human blood plasma proteins in vitro was evaluated. It was established that liver and lung cells were the most sensitive to the toxic effects of heavy metal salts, while skin cells and lymphocytes were the least vulnerable. It was investigated that metal compounds caused significant conformational changes in blood proteins. The most pronounced denaturing effect on proteins was exerted by lead acetate in all studied concentrations. The cytotoxicity of metals decreased in the order $Hg > Cd > Pb > Mn$, and the denaturing activity in the sequence $Pb > Hg > Cd > Mn$. Based on the results of the study, the concentration of the metal compound (LC_{50}), which caused 50% cell death compared to the control, was calculated.

Key words: cell culture, blood proteins, heavy metals, toxicity in vitro.

Дослідження виконано в рамках НДР: «Наукове обґрунтування принципів, методів і показників експериментальної оцінки токсичності наночастинок і наноматеріалів (на прикладі важких металів), № Держреєстрації 0113U001447

Дмитруха Наталя Михаїлівна ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9161-3889>,

+ 38 044 2895185, dmytrukha@ukr.net

Надійшла до редакції / Receiv: 31.03.2023