

© Мицик Н. Й., Ольхович Н. В., Горовенко Н. Г.

УДК 616-056.7-07

^{1,2}Мицик Н. Й., ^{1,2}Ольхович Н. В., ^{2,3}Горовенко Н. Г.

ОСОБЛИВОСТІ ОЦІНКИ АКТИВНОСТІ В-ГАЛАКТОЗИДАЗИ В ДІАГНОСТИЦІ ЛІЗОСОМНИХ ХВОРОБ НАКОПИЧЕННЯ СЕРЕД НАСЕЛЕННЯ УКРАЇНИ

¹Центр орфанних захворювань, НДСЛ «Охматдит» (м. Київ)

²Відділ генетичної діагностики, ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини
НАМН України» (м. Київ)

³Кафедра медичної та лабораторної генетики НМАПО
ім. П. Л. Шупика (м. Київ)

mycyk_nat@ukr.net

Представлена робота являється фрагментом НДР «Оцінка ролі генетичних факторів у формуванні та перебігу лізосомних хвороб накопичення для оптимізації клінічної і лабораторної діагностики цих захворювань» та виконана на базі ДУ «ІГРМ НАМН України», № державної реєстрації 0115U003006.

Вступ. Лізосомні хвороби накопичення (ЛХН) — це великий клас спадкових хвороб обміну речовин, які обумовлені генетичними змінами лізосомних ферментів, що контролюють процес внутрішньоклітинного розщеплення таких макромолекул, як глікозаміноглікани, гліколіпіди, глікопротеїни [9]. Наслідками цих змін є внутрішньолізосомне накопичення нерозщеплених макромолекул, що призводить до порушення нормального функціонування клітин та формування патологічних змін в органах та системах [9]. ЛХН характеризуються значною генетичною гетерогенністю та клінічним поліморфізмом, що призводить до труднощів у розмежуванні різних захворювань, які мають подібні зміни біохімічних маркерів при різній генетичній природі.

Саме до таких належить група захворювань, при яких основні зміни в організмі пов'язані зі зниженням активності лізосомного ферменту кислотної β-галактозидази. На сьогоднішній день описано три клінічних захворювання, пов'язаних з дефіцитом лізосомної β-галактозидази: GM1-гангліозидоз, галактосіалідоз та мукополісахаридоз IV B (синдром Моркіо B) [8].

β-галактозидаза (ЕС 3.2.1.23) — лізосомний фермент, що відноситься до класу кислих гідролаз і контролює відщеплення термінального залишку десульфатованої галактози в різних біомолекулах організму: гліколіпідах (гангліозид GM1, асіало-GM1), що містяться переважно в нервовій тканині, кератансульфатоподібних глікозаміногліканах, що є компонентами екстраклітинного матриксу хрящової тканини та рогівки, а також в глікопротеїнах з вуглеводними латеральними ланцюгами [11]. Дефіцит активності цього ферменту призводить до накопичення перерахованих метаболітів в лізосомах усіх типів тканин, що супроводжується цитотоксичним ефектом і призводить до розвитку у пацієнтів нейродегенеративної патології з прогресуючим перебігом.

Метаболічний дефект при GM1-гангліозидозі та синдромі Моркіо B обумовлений мутаціями в структурному гені лізосомної β-галактозидази — GLB1 [3,4]. При галактосіалідозі метаболічний дефект пов'язаний з мутацією структурного гена CTSA, що контролює синтез білка — стабілізатора лізосомних ферментів β-галактозидази і нейрамінідази, та призводить до вторинного дефіциту останніх і, як наслідок, до накопичення сіаловмісних олігосахаридів та сіалових кислот в лізосомах [5,8,9]. Таким чином, ці три захворювання мають різну клінічну картину та обумовлені різними етіологічними факторами, але всі супроводжуються вираженим зниженням активності β-галактозидази. Саме це дозволяє використовувати показник метаболічного дефекту β-галактозидази для постановки первинного діагнозу і планування подальшої диференціальної діагностики вказаної патології.

Слід зазначити, що ферментативний аналіз дуже чутливий до особливостей процедури отримання матеріалу, до якості біологічного матеріалу, а також до умов проведення дослідження і особливостей біологічної варіації ферментативної активності певної популяції [9]. Тому дуже важливим є визначення в кожній діагностичній лабораторії власних специфічних референсних значень активності лізосомних ферментів в різному біологічному матеріалі.

Метою нашої роботи було встановлення референсних значень активності β-галактозидази в лейкоцитах та плазмі крові у населення України та визначення активності даного ензиму у пацієнтів з GM1-гангліозидозом, галактосіалідозом та синдромом Моркіо B та у членів їх родин, для розробки критеріїв оцінки результатів біохімічного обстеження при проведенні диференційної діагностики цієї патології в родинях високого ризику.

Об'єкт і методи дослідження. Матеріалом для дослідження були зразки венозної крові з ЕДТА, отриманої у 27 пацієнтів з різних регіонів України, яким в період з 2004 по 2015 роки в Спеціалізованому медико-генетичному центрі (СМГЦ) і Центрі орфанних захворювань НДСЛ «ОХМАТДИТ» МОЗ України (ЦОЗ) було встановлено діагноз GM1-гангліозидоз, галактосіалідоз та синдром Моркіо

Активність β-галактозидази в лейкоцитах та плазмі крові у пацієнтів з GM1-гангліозидозом, гетерозигот і здорових осіб контрольної групи з України

Показник	Лейкоцити (нМоль/год/мг білка)			Плазма крові (нМоль/год/мл плазми)		
	пацієнти	гетерозиготи	контроль	пацієнти	гетерозиготи	контроль
Середнє значення	1,86	75,9	182	0,34	1,5	2,04
Максимальне значення	7	115	295	0,7	2,8	4,5
Мінімальне значення	0	30	90	0	0,9	0,94
Референсний інтервал (5%-95%)	0-4,6	47-112	118-290	0,08-0,64	0,9-2,7	0,98-3,8
Кількість осіб	25	38	102	25	38	102

В, та їх батьків (38 осіб), а також зразки крові групи контролю – 102 добровільні донори віком від 18 до 60 років без наявності клінічних ознак лізосомної патології, які дали згоду на проведення дослідження та склали групу контролю.

Всі дослідження проводилися в лабораторії медичної генетики СМГЦ з використанням атестованого лабораторного обладнання та реактивів з чистою «чда» і вище.

Для визначення активності β-галактозидази в лізаті лейкоцитів використовували флюорогенний субстрат 4-метилумбеліферил (МУФ)-β-D-галактопіранозиду (MU-β-Gal; MW 338,3; SIGMA) [6]. Реакційна суміш складалась з 20 мкл розчину субстрату (2 мМ 4- МУФ-β-D-галактопіранозид в 0,1М/0,2М цитрат фосфатному буфері, рН 4,0 з додаванням 0,1 М NaCl) та 20 мкл лізату лейкоцитів з розрахунку на 30 мкг білка. Реакцію проводили протягом 30 хв при 37°C та зупиняли додаванням до реакційної суміші 600 мкл 0,2 М NaOH-гліцинового буфера, рН 10,6.

В якості стандартного розчину для обох ферментів використовували 500 мкМ розчин 4-метилумбеліферону (Sigma). Флюоресценцію звільненого 4-метилумбеліферону вимірювали за допомогою багатофункціонального аналізатора Victor (Wallac Oy) при довжині хвилі збудження 365 нм та емісії 448 нм. Отримані результати активності β-галактозидази наводилась у нмоль/год/мг білка.

Статистична обробка результатів дослідження проводилась за допомогою електронних таблиць MS Excel та пакету статистичних програм Statistica 10.0. Нормальність розподілу даних β-галактозидазної активності було визначено за критерієм Шапіро-Уїлка. Для групи пацієнтів з галактосіалідозом та синдромом Моркіо В, було застосовано поправку Йетса для малої вибірки. Для оцінки достовірності різниці між β-галактозидазною активністю у здорових осіб, гетерозигот та пацієнтів з дефіцитом β-галактозидази було використано критерій Манна-Уїтні.

Результати дослідження та їх обговорення. Першим етапом нашого дослідження була оцінка рівня активності β-галактозидази в зразках лей-

коцитів та плазмі периферійної крові в групі контролю (n=102) з різних регіонів України для визначення референсних значень цих показників. Враховуючи відсутність вікових коливань активності лізосомних ферментів, для визначення референтних значень активності β-галактозидази використовували зразки крові добровільних донорів різного віку. Аналіз отриманих результатів активності β-галактозидази в лейкоцитах та в плазмі крові у здорових осіб представ-

лено в таблиці. Для визначення референсних значень β-галактозидазної активності у здорових осіб було розраховано референсний інтервал між 5-м та 95-м перцентиліями (табл.), як рекомендовано IFCC та NCCLS [7, 10]. Ці значення були прийняті нами як критерії нормальної активності β-галактозидази в лейкоцитах та плазмі крові для населення України.

На другому етапі нами було проаналізовано значення активності β-галактозидази в лейкоцитах периферичної крові та у плазмі в 25 пацієнтів, яким на підставі комплексу клінічних даних, позитивних результатів селективного скринінгу методом виявлення олігосахаридів сечі [1], ензимодіагностики та молекулярно-генетичних даних було підтверджено діагноз GM1-гангліозидоз, а також їх батьків (38 осіб).

Для усіх пацієнтів з GM1-гангліозидозом було характерним різке зниження активності β-галактозидази в лейкоцитах та плазмі крові, референсний інтервал яких не перекривався із значеннями β-галактозидази у контрольних зразках та у зразках їх батьків (табл.).

Розподіл показників активності β-галактозидази в групі пацієнтів з GM1-гангліозидозом та їх батьків не відповідав критеріям нормальності (p = 0,011, p<0,05), тому для оцінки достовірності різниці між ними та активністю у здорових осіб було використано критерій Мана-Уїтні. Аналіз підтвердив, що активність β-галактозидази в лейкоцитах пацієнтів

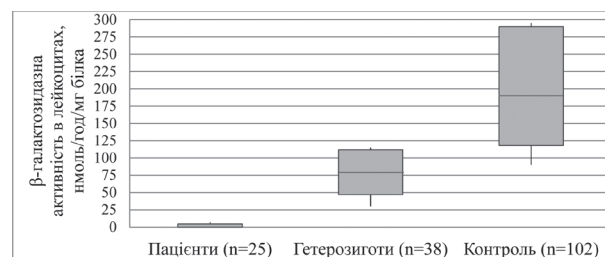


Рис. 1. Активність β-галактозидази в лейкоцитах крові у пацієнтів з GM1-гангліозидозом, їх батьків (гетерозигот) та у контрольній групі.

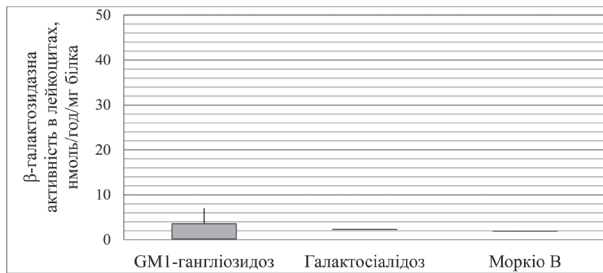


Рис. 2. Активність β-галактозидази в лейкоцитах крові у пацієнтів з GM1-гангліозидозом, галактосіалідозом та синдромом Моркію В.

з GM1-гангліозидозом достовірно відрізнялась від активності у батьків, які являються гетерозиготними носіями та здорових осіб (рис. 1).

Отже, зважаючи на отримані результати, визначення активності β-галактозидази в лейкоцитах крові доцільно використовувати, як підтверджуючий метод в діагностиці GM1-гангліозидозу.

Крім того, середня активність β-галактозидази в лейкоцитах гетерозиготних носіїв достовірно відрізняється від цього показника у здорових осіб, що дозволяє попередньо запідозрити гетерозиготне носійство генетичного дефекту β-галактозидази в ході біохімічного обстеження у членів родин обтяжених цією патологією. Та остаточний висновок про наявність гетерозиготного носійства можна зробити лише при проведенні молекулярно-генетичного обстеження.

У одного із пацієнтів (П.П.) при низькому рівні активності β-галактозидази в лейкоцитах крові – 2,32 нМоль/год/мг білка спостерігалась нормальна активність β-галактозидази в плазмі крові – 2,4 нМ/год/мл плазми, що не співпадало з низьким рівнем показників активності даного ензиму в плазмі крові у пацієнтів з GM1-гангліозидозом (рис. 2, 3). Такий результат свідчив на користь наявності у пацієнта П.П. такого лізосомного захворювання, як галактосіалідоз [5,8,9].

Під час проведення біохімічного селективного скринінгу пацієнтам з підозрою на наявність ЛХН, методами тонкошарової хроматографії олігосахаридів сечі та глікозаміногліканів сечі [1,2], у пацієнта С.С. було виявлено нормальний вміст олігосахаридів та високий вміст кератансульфату в сечі, що характерно для синдрому Моркію [2,4,8]. Проте розмежування підтипів синдрому Моркію А і В можливе лише при визначенні первинного ферментативного дефекту. В лейкоцитах та плазмі крові даного пацієнта показники активності β-галактозидази були низькими та становили 1,9 нМоль/год/мг білка, і в плазмі – 0,33 нМ/год/мл плазми, що разом з результатами клінічного обстеження дало можливість встановити пацієнту С.С. діагноз – синдром Моркію В.

Порівнюючи результати активності β-галактозидази в лейкоцитах крові при GM1-гангліозидозі, галактосіалідозі та синдромі Моркію В, було показано, що активність даного ензиму при всіх трьох патологіях достовірно не відрізняється, що не дає змогу диференціювати ці три захворювання, використовуючи для даного методу лише лейкоцити крові (рис. 2).

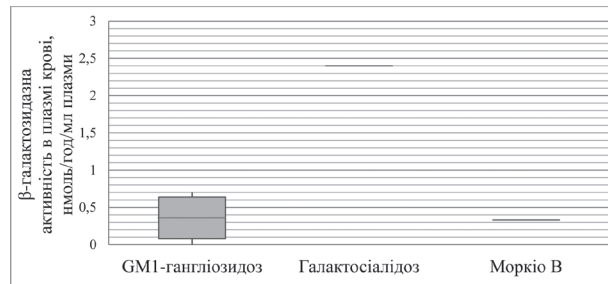


Рис. 3. Активність β-галактозидази в плазмі крові у пацієнтів з GM1-гангліозидозом, галактосіалідозом та синдромом Моркію В.

Проте, інша ситуація відмічається при визначенні активності β-галактозидази в плазмі крові, де у пацієнта з галактосіалідозом спостерігалась нормальна активність β-галактозидази, тоді як при GM1-гангліозидозі та синдромі Моркію В активність даного ензиму значно знижена (рис. 3), що дає змогу використовувати даний біомаркер при диференціальній діагностиці цих трьох патологій.

Отже, метод визначення активності β-галактозидази в гомогенаті лейкоцитів та плазмі крові має велику діагностичну значимість в процесі біохімічної діагностики GM1-гангліозидозу, галактосіалідозу та синдрому Моркію В. Існує чітке розмежування значень активності цього ферменту в лейкоцитах крові пацієнтів з зазначеною патологією, у гетерозиготних носіїв та у здорових осіб. Рівень активності β-галактозидази в плазмі крові має велике діагностичне значення для попереднього відокремлення пацієнтів з галактосіалідозом від пацієнтів з GM1-гангліозидозом та синдромом Моркію В. Але для остаточної диференціації окремих нозологій даної групи захворювань у пацієнтів з дефіцитом активності β-галактозидази, є необхідним проведення молекулярно-генетичних методів діагностики.

Висновки

1. Визначення активності β-галактозидази в лейкоцитах та плазмі крові доцільно використовувати в діагностиці GM1-гангліозидозу, галактосіалідозу та синдрому Моркію В.

2. Для усіх пацієнтів з GM1-гангліозидозом та синдромом Моркію В характерне різке зниження активності β-галактозидази як в лейкоцитах, так і в плазмі крові.

3. При галактосіалідозі різке зниження активності β-галактозидази характерне лише для лейкоцитів крові, тоді як в плазмі крові спостерігається нормальна активність ензиму, тому для виокремлення галактосіалідозу від GM1-гангліозидозу, та синдрому Моркію В обов'язковим є визначення активності β-галактозидази не лише в лейкоцитах, а і в плазмі крові.

4. При проведенні диференціальної діагностики GM1-гангліозидозу та синдрому Моркію В, крім результатів визначення активності β-галактозидази, необхідно враховувати також результати селективного скринінгу лізосомних хвороб накопичення, а саме, оцінку екскреції глікозаміногліканів та олігосахаридів з сечею.

5. Середня активність β -галактозидази в лейкоцитах гетерозиготних носіїв достовірно відрізняється від цього показника у здорових осіб, що дозволяє попередньо запідозрити гетерозиготне носійство генетичного дефекту β -галактозидази в ході біохімічного обстеження членів родин обтяжених цією патологією, проте остаточний висновок про гетеро-

зиготне носійство можна зробити по результатам молекулярної діагностики.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому, для остаточної диференціації окремих нозологій даної групи захворювань у пацієнтів з дефіцитом активності β -галактозидази, є необхідним проведення молекулярно-генетичної діагностики.

Література

1. Мицик Н.Й. Селективний біохімічний скринінг лізосомних хвороб накопичення методом тонкошарової хроматографії олігосахаридів / Н.Й. Мицик, Н.В. Ольхович, Н.Г. Горovenko // Вісник проблем біології і медицини. – 2016. – Том 1. – № 1. – С. 222-227.
2. Трофімова Н.С. Використання скринуючих біохімічних досліджень для ранньої діагностики мукополісахаридозів / Н.С. Трофімова, Н.В. Ольхович, Н.Г. Горovenko // Вісник проблем біології і медицини. – 2015. – Том 2 (123). – № 3. – С. 245-250.
3. Brunetti-Pierri N. GM1 gangliosidosis: Review of clinical, molecular, and therapeutic aspects / N. Brunetti-Pierri, F. Scaglia // Molecular Genetics and Metabolism. – 2008. – Vol. 94. – P. 391-396.
4. Caciotti A. GM1 gangliosidosis and Morquio B disease: An update on genetic alterations and clinical findings / A. Caciotti, S.C. Garman, Y. Rivera-Colyn [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta. – 2011. – Vol. 1812. – P. 782-790.
5. Caciotti A. Galactosialidosis: review and analysis of CTSA gene mutations / A. Caciotti, S. Catarzi, R. Tonin, L. Lugli, C. Rodriguez Perez, H. Michelakakis, I. Mavridou, M. Alice Donati, R. Guerrini, A. d'Azzo, A. Morrone // Orphanet Journal of Rare Diseases. – 2013. – № 8. – P. 114-123.
6. Hommes F.A. Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics/ F.A. Hommes. — A Laboratory Manual, 1991. – P. 587.
7. Horn P.S. Reference intervals: an update / P.S. Horn, A.J. Pesce // Clin Chim Acta. – 2003. – Vol. 334. – P. 5-23.
8. Johnson William G. β -Galactosidase Deficiency: GM1 Gangliosidosis, Morquio B Disease, and Galactosialidosis / William G. Johnson // The Molecular and Genetic Basis of Neurologic and Psychiatric Disease. – 2007. – № 4. – P. 274-281.
9. Mehta A. Lysosomal storage disorders: a practical guide / A. Mehta, B. Winchester. — Wiley-Blackwell, 2012. – P. 197.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2001) How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline, NCCLS document C28-A and C28-A2. Villanova, NCCLS.
11. Ohto U. Crystal structure of human β -galactosidase: structural basis of GM-gangliosidosis and Morquio B diseases / U. Ohto, K. Usui, T. Ochi, K. Yuki, Y. Satow and T. Shimizu // Journal of biological chemistry. – 2012. – Vol. 287. – P. 1801-1812.

УДК 616-056.7-07

ОСОБЛИВОСТІ ОЦІНКИ АКТИВНОСТІ В-ГАЛАКТОЗИДАЗИ В ДІАГНОСТИЦІ ЛІЗОСОМНИХ ХВОРОБ НАКОПИЧЕННЯ СЕРЕД НАСЕЛЕННЯ УКРАЇНИ

Мицик Н. Й., Ольхович Н. В., Горovenko Н. Г.

Резюме. Серед лізосомних хвороб накопичення важливе місце належить групі захворювань, пов'язаних з дефіцитом лізосомної β -галактозидази: GM1-гангліозидоз, галактосіалідоз та мукополісахаридоз IV B (синдром Моркіо B).

Метою нашої роботи було встановлення референсних значень активності β -галактозидази в лейкоцитах та плазмі крові у населення України та визначення активності даного ензиму у пацієнтів з GM1-гангліозидозом, галактосіалідозом та синдромом Моркіо B та у членів їх родин, для розробки критеріїв оцінки результатів біохімічного обстеження при проведенні диференційної діагностики цієї патології в родинах високого ризику.

На підставі проведеного дослідження встановлено, що визначення активності β -галактозидази в лейкоцитах та плазмі крові доцільно використовувати в діагностиці GM1-гангліозидозу, галактосіалідозу та синдрому Моркіо B, за умови врахування результатів селективного скринінгу лізосомних хвороб накопичення, а саме, екскреції глікозаміногліканів та олігосахаридів з сечею.

Ключові слова: β -галактозидаза, GM1-гангліозидоз, галактосіалідоз, синдром Моркіо B.

УДК 616-056.7-07

ОСОБЕННОСТИ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ В-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ЛИЗОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ НАКОПЛЕНИЯ СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ УКРАИНЫ

Мыцик Н. И., Ольхович Н. В., Горovenko Н. Г.

Резюме. Среди лизосомных болезней накопления важное место принадлежит группе заболеваний, связанных с дефицитом лизосомной β -галактозидазы: GM1-гангліозидоз, галактосиалидоз и мукополисахаридоз IV B (синдром Моркио B).

Целью нашей работы было определение референсных значений активности β -галактозидазы в лейкоцитах и плазме крови у населения Украины и определения активности данного энзима у пациентов с GM1-гангліозидозом, галактосиалидозом и синдромом Моркио B и у членов их семей, для разработки критериев оценки результатов биохимического обследования при проведении дифференциальной диагностики этой патологии в семьях высокого риска.

На основании проведенного исследования установлено, что определение активности β -галактозидазы в лейкоцитах и плазме крови целесообразно использовать в диагностике GM1-гангліозидоза, галактоси-

алидоза и синдрома Моркио В, при условии учитывания результатов селективного скрининга лизосомных болезней накопления, а именно, экскреции гликозаминогликанов и олигосахаридов с мочой.

Ключевые слова: β -галактозидаза, GM1-ганглиозидоз, галактосиалидоз, синдром Моркио В.

UDC 616-056.7-07

FEATURES EVALUATE THE ACTIVITY OF β -GALACTOSIDASE IN THE DIAGNOSTICS OF LYSOSOMAL STORAGE DISORDERS AMONG UKRAINIAN POPULATION

Mytsyk N. Y., Olkhovych N. V., Gorovenko N. G.

Abstract. Lysosomal storage disorders (LSD) are a large class of hereditary metabolism disorders, conditioned by genetic changes of lysosomal enzymes, which control the process of intracellular breakdown of such macromolecules as glycosaminoglycans, glycolipids, glycoproteins. A relevant place among lysosomal storage disorders is attributed to the group of diseases, related to the deficiency of lysosomal β -galactosidase: GM1-gangliosidosis, galactosialidosis and mucopolysaccharidosis IV B (Morquio B syndrome). In this respect, the problem of differential diagnostics of this group of lysosomal diseases, characterized by common metabolic deficiency, is very urgent.

The aim of our work was to determine reference values of β -galactosidase activity in leukocytes and blood plasma for Ukrainian population and to determine the activity of this enzyme in the patients with GM1-gangliosidosis, galactosialidosis, and Morquio B syndrome and their family members, with the purpose of elaborating the criteria of evaluating the results of biochemical examination while conducting differential diagnostics of this pathology in high risk families.

Materials and methods. The samples of venous blood of 27 patients from different regions of Ukraine with confirmed diagnosis of GM1-gangliosidosis, galactosialidosis, and Morquio B syndrome, as well as those of their parents (38 individuals) and of 102 healthy individuals, who consented to participate in the investigation and served as a control group, were used as the materials of the investigation.

The activity of β -galactosidase in the lysate of leukocytes was determined using fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl (MUF)- β -D-galactopiranoside.

Results and discussion. The reference interval for healthy people was calculated in the range between the 5th and 95th percentiles, which amounted to 115–288 nmol/h/mg of protein for leukocytes and 0.98–3.8 nmol/h/ml plasma for plasma. These values were accepted by us as the normal activity criteria of β -galactosidase for Ukrainian population.

All the patients with GM1-gangliosidosis were remarkable for sharp decrease in the activity of β -galactosidase in leukocytes and blood plasma, the reference interval of which did not overlap the values of β -galactosidase in the control samples and in the samples of their parents. The activity of β -galactosidase in the leukocytes of heterozygous carriers was considerably different from this index for healthy individuals, which allows for preliminary assumption on heterozygous carriage of the genetic deficiency of β -galactosidase in the families, suffering from this pathology. In case of galactosialidosis, the decrease in the activity of β -galactosidase was remarkable only for blood leukocytes, whereas normal activity of the enzyme was observed in the blood plasma, thus, the differential diagnostics of GM1-gangliosidosis, galactosialidosis, and Morquio B syndrome requires the determination of β -galactosidase activity both in plasma and in the leukocytes.

Conclusions. The determination of β -galactosidase activity in the leukocytes and blood plasma should be used as a confirmatory method in the diagnostics of GM1-gangliosidosis, galactosialidosis, and Morquio B syndrome, after the selective diagnostics methods, in particular, the determination of the level of oligosaccharides and glycosamines in urine.

Keywords: β -galactosidase, GM1-gangliosidosis, galactosialidosis, Morquio B syndrome.

Рецензент – проф. Скрипник І. М.

Стаття надійшла 07.10.2016 року