

ЗМІНА ВМІСТУ ОСНОВНОГО БІЛКА МІЄЛІНУ В РІЗНИХ ВІДДІЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ ПІД ЧАС ПОСТНАТАЛЬНОГО РОЗВИТКУ

Ю.П.Ковальчук, Г.О.Ушакова

Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара

Ключові слова:
основний білок
мієліну, мозок,
постнатальний
розвиток.

Клінічна та
експериментальна
патологія Т.17, №3
(65). С.58-62.

DOI:10.24061/1727-
4338.XVII.3.65.2018.158

E-mail:
yulka.5868152@
ukr.net

Мета роботи - дослідити особливості розподілу основного білка мієліну (ОБМ) у різних відділах головного мозку щурів на різних етапах постнатального розвитку.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на щурах лінії Вістар. Для дослідження постнатального розвитку використано 24 щури. Тварин розподілено на чотири групи за віком ($n = 6$): 1 - новонароджені тварини (1 день), 2 - 30, 3 - 90, 4 - 180 днів. З мозку виділяли три відділи: мозочок, таламус і гіпокамп, які в подальшому використовували для отримання цитозольних білкових фракцій. Рівень загального білка в отриманих фракціях визначали за методом Бредфорда. Вміст ОБМ визначали за методикою імуноферментного аналізу. Статистична обробка результатів проведена за однофакторним дисперсійним аналізом ANOVA.

Результати. Загальний пул білків у цитозольних фракціях, отриманих із різних відділів головного мозку новонароджених щурів, встановлено на рівні $1,93 - 2,21$ мг/мл. У мозочку та таламусі щурів спостерігалось поступове збільшення загального вмісту білків у процесі розвитку до 90 днів: у мозочку - до $2,77 \pm 0,19$ мг/мл, таламусі - до $3,07 \pm 0,21$ мг/мл, а на 180 добу постнатального розвитку встановлено значне зменшення рівня загального вмісту білків порівняно з 90 денними тваринами. У гіпокампі визначено поступове зменшення загального вмісту білків у процесі розвитку тварин порівняно з новонародженими. За результатами досліджень у новонароджених (1-денних) щурів зазначено незначну кількість ОБМ, концентрація ОБМ значно збільшується впродовж першого місяця розвитку тварин. У мозочку 30 денних щурів концентрацію основного білка мієліну зазначено на рівні $4,56 \pm 0,28$ мкг/100 мг тканини, у таламусі - $1,99 \pm 0,42$ мкг/100 мг тканини, у гіпокампі - $0,63 \pm 0,08$ мкг/100 мг тканини. На 90 день постнатального розвитку тварин встановлено стрімке збільшення рівня ОБМ у гіпокампі до $2,29 \pm 0,72$ мкг/100 мг тканини. Вміст ОБМ у мозочку 30-денних щурів є найвищою серед інших відділів головного мозку. Це вказує на те, що у мозочку процеси мієлінізації розпочинаються одразу після народження тварин і досягають максимуму на 30 добу постнатального розвитку. Вміст основного білка мієліну на 180 днів постнатального розвитку має тенденцію до зменшення у всіх досліджуваних відділах головного мозку щурів.

Висновки. Встановлені кількісні показники основного білка мієліну впродовж постнатальногорозвитку, які мають специфіку залежно від відділу мозку та терміну формування мієлінової оболонки під час онтогенезу нервової системи щурів.

Ключевые слова:
основной белок
миелина, мозг,
постнатальное
развитие.

Клиническая и
экспериментальная
патология Т.17, №3
(65). С.58-62.

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ОСНОВНОГО БЕЛКА МИЕЛИНА В РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ПОСТНАТАЛЬНОМ РАЗВИТИИ

Ю.П. Ковальчук, Г.А. Ушакова

Цель работы - исследовать особенности распределения основного белка миелина(ОБМ) в различных отделах головного мозга крыс на разных этапах постнатального развития. **Материалы и методы.** Исследования проводили на крысах линии Вистар. Для изучения постнатального развития использованы 24 крысы. Животных разделили на четыре группы по возрасту ($n = 6$): 1 - новорожденные животные (1 день), 2 - 30, 3 - 90, 4 - 180 дней. Из мозга выделяли три отдела: мозжечок, таламус и гиппокамп, которые в дальнейшем использовали для получения белковых фракций. Уровень общего белка в полученных фракциях определяли по методу Бредфорда. Содержание ОБМ определяли с помощью иммуноферментного анализа. Статистическая обработка результатов проведена с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA. **Результаты.** Общий пул белков в цитозольных фракциях, полученных из разных отделов головного мозга новорожденных крыс, установлен на уровне $1,93 - 2,21$ мг/мл. В мозжечке и таламусе наблюдалось постепенное увеличение общего содержания белков у животных в процессе развития до 90 дней: в мозжечке - до $2,77 \pm 0,19$ мг/мл, таламусе - до $3,07 \pm 0,21$ мг/мл, а на 180 сутки постнатального развития установлено значительное снижение уровня общего содержания белков по сравнению с 90 дневными животными. В гиппокампе определено постепенное уменьшение общего содержания белков в

процессе развития животных по сравнению с новорожденными. В результате исследований у новорожденных (1-дневных) крыс отмечено незначительное количество ОБМ, концентрация ОБМ значительно увеличивается в течение первого месяца развития животных. В мозжечке 30 дневных крыс концентрация основного белка миеллина установлена на уровне $4,56 \pm 0,28$ мкг/100 мг ткани, в таламусе - $1,99 \pm 0,42$ мкг/100 мг ткани, в гиппокампе - $0,63 \pm 0,08$ мкг/100 мг ткани. На 90 день постнатального развития животных установлено стремительное увеличение уровня ОБМ в гиппокампе до $2,29 \pm 0,72$ мкг/100 мг ткани. Содержание ОБМ в мозжечке 30 дневных крыс является самым высоким среди других отделов головного мозга. Это указывает на то, что сразу после рождения животных в мозжечке начинаются процессы миелинизации и достигают максимума на 30-е сутки постнатального развития. Содержание основного белка миеллина на 180 дней постнатального развития имеет тенденцию к уменьшению во всех исследуемых отделах головного мозга крыс. **Выводы.** Установлены количественные показатели основного белка миеллина в течение постнатального развития, которые имеют специфику в зависимости от отдела мозга и срока формирования миелиновой оболочки в ходе онтогенеза нервной системы млекопитающих.

CHANGES IN THE CONTENT OF THE MYELIN BASIC PROTEIN IN DIFFERENT AREAS OF THE RATS BRAIN UNDER POSTNATAL DEVELOPMENT

Y.P. Kovalchuk, G.A. Ushakova

Objective - to study the features of the myelin basic protein (MBP) distribution in different areas of the rat brain under postnatal development.

Material and methods. The studies were conducted on Wistar line rats. 24 rats were used to study postnatal development. Animals were divided into four groups by age ($n = 6$): 1 - newborn animals (1 day), 2 - 30 days, 3 - 90 days, 4 - 180 days of postnatal development. Three divisions (cerebellum, thalamus and hippocampus) were isolated from the brain, which later on were used to produce the protein fractions. The level of total protein in the obtained extractions was determined by the Bradford method. The level of MBP was measured with competitive ELISA. Statistical processing of the results was carried out according to a single-factor dispersion ANOVA test. **Results.** The total pool of proteins in cytosolic fractions obtained from different brain areas of newborn rats was set at 1.93 - 2.21 mg/ml level. A gradual increase of the total protein content in the cerebellum and thalamus was noted in the process of development up to 90 days: in the cerebellum - to 2.77 ± 0.19 mg/ml, thalamus - to 3.07 ± 0.21 mg/ml, and a significant decrease of the total protein content was observed on the 180th day of the postnatal development in comparison with 90 day-old animals. In the hippocampus a gradual decrease of the total protein content was determined in the process of animals' development as compared with newborns. According to our study, in the newborns (1-day) rats, a small amount of MBP was noted. The MBP concentration significantly increases during the first month of animal development. In 30 day rats concentration of myelin basic protein was established in cerebellum on the level of $4,56 \pm 0,28$ μ g/100 mg of tissue, in the thalamus - $1,99 \pm 0,42$ μ g/100 mg of tissue, in the hippocampus - $0,63 \pm 0,08$ μ g/100 mg of tissue. On the 90th day of postnatal development of animals, a rapid increase of MBP in the hippocampus to 2.29 ± 0.72 μ g/100 mg of tissue was observed. The content of MBP in the cerebellum of 30-day-rats was the highest among other areas of the rat brain. This indicates that in the cerebellum the processes of myelination begin immediately after the birth of animals and reach a maximum on the 30th day of postnatal development. The content of the myelin basic protein for 180 days of the postnatal development tends to decrease in all studied areas of the rat brain. **Conclusions.** Quantitative indices of the myelin basic protein were noted under postnatal development that have specificity depending on the brain area and the period of myelin membrane formation during ontogenesis of the rat nervous system.

Key words:

myelin basic protein, brain, postnatal development.

Clinical and experimental pathology. Vol.17, №3 (65). P.58-62.

Вступ

Мієлінізація нервових волокон центральної нервової системи (ЦНС) - це складний динамічний процес, в основі якого лежить багаторівнева координація проліферації і диференціації клітин-попередників у зрілі олігодендроцити. Ці процеси необхідні для побудови мієлінових оболонок навколо аксонів нейронів, що, в

свою чергу, служить умовою для забезпечення швидкої стрибкоподібної нервової провідності. Розкриття механізмів і молекулярних посередників мієлінізації є важливою ланкою для розуміння біології нейро-гліальних взаємодій і має важливе практичне значення під час лікування демієлінізуючих розладів ЦНС [1]. Мієлінові оболонки нервових клітин центральної нервової систе-

ми і периферичної нервової системи мають високий вміст специфічного маркерного білка - основного білка мієліну (ОБМ) [2]. Показано, що нервові волокна, у складі яких виявлено цей білок, можуть максимально ефективно проводити нервові збудження [3, 4]. ОБМ визначає специфічність нервової тканини, оскільки зниження його експресії індукує порушення перебігу мієлінізуючих процесів у мозку [5]. Коливання концентрації цього білка в різних відділах головного мозку - важливий діагностичний показник багатьох патологічних станів ЦНС. Період постнатального розвитку гризунів є достатньо складним та динамічним процесом. У ньому умовно можна виділити три етапи: етап раннього постнатального розвитку, етап зрілості та етап пізнього постнатального розвитку (період старіння, старечий період). Кожний з цих інтервалів характеризується певним розвитком нервової системи та різним характером процесів мієлінізації нервових волокон [6]. Старіння мозку є основним фактором ризику розвитку нейродегенеративних захворювань, які призводять до зниження пізнавальної активності і старечого недоумства. Глибше вивчення особливостей розподілу ОБМ у головному мозку та впливу зміни кількості мієліну на моторні функції може допомогти в розробці методик уповільнення або навіть запобігання старінню мозку. Вчені припускають, що у людини насиченість мієліном у мозку збільшується до середнього віку й після піку в 39 років починає зменшуватися. Bartzokis G., як і деякі інші учені, припускає, що старіння мозку може бути безпосередньо пов'язане із зменшенням кількості мієліну в мозку [7].

Мета роботи

Дослідити особливості розподілу ОБМ у різних відділах головного мозку щурів на різних етапах постнатального розвитку.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводили на 24 щурах лінії Вістар. Тварин розподілено на чотири групи за віком (n = 6): 1 -

новонароджені тварини (1 день), 2 - 30, 3 - 90, 4 - 180 днів. Щури знаходилися за стандартних умов з природною зміною освітлення і дотриманням загальновіварійного раціону. У всіх тварин був вільний доступ до їжі та води. Експеримент проводився згідно з "Положенням про використання тварин в біомедичних дослідках" [8]. Наприкінці експерименту тварин декапітували під наркозом тіопентал натрію (40 мкг/кг). З мозку виділяли три відділи: мозочок, таламус і гіпокамп, які в подальшому використовували для отримання цитозольних білкових фракцій за допомогою ультрацентрифугування. Вихідний буфер містив трис - 0,25 мМ (pH7,4), етилендіамінтетраоцет (ЕДТО) - 1 мМ, дитіотрейтол - 2 мМ, фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ) - 0,2 мМ, азид натрію (NaN₃) - 3 мМ (вказані реагенти придбані у Sigma, США).

Рівень загального білка в отриманих фракціях визначали за методом Бредфорда та виражали у мг/мл [9].

Вміст ОБМ у мозочку, таламусі та гіпокампі визначали відповідно до імуноферментного аналізу з використанням козячих моно специфічних поліклональних антитіл проти ОБМ і вторинних анти козячих анти-IgG, мічених пероксидазою (Santa Cruz Biotechnology, США) та високоочишеного ОБМ (Sigma, США) як стандарту [10]. Отримані результати вимірювали за допомогою ІФА-рідера Anthos 2010 (Фінляндія) при 492 нм. Кількість білків виражали в мкг на 100мг тканини.

Статистична оцінка даних виконана з використанням пакета Microsoft Excel 2013 за однофакторним дисперсійним аналізом ANOVA. Статистично значущими вважалися дані при P < 0,05.

Результати та їх обговорення

У ході експерименту на першому етапі досліджено загальну кількість білків. Загальний пул білків у цитозольних фракціях, отриманих із різних відділів головного мозку новонароджених щурів, встановлено на рівні 1,93 - 2,21 мг/мл (рис.1). У мозочку та таламусі спостерігали поступове збільшення загального вмісту білків у

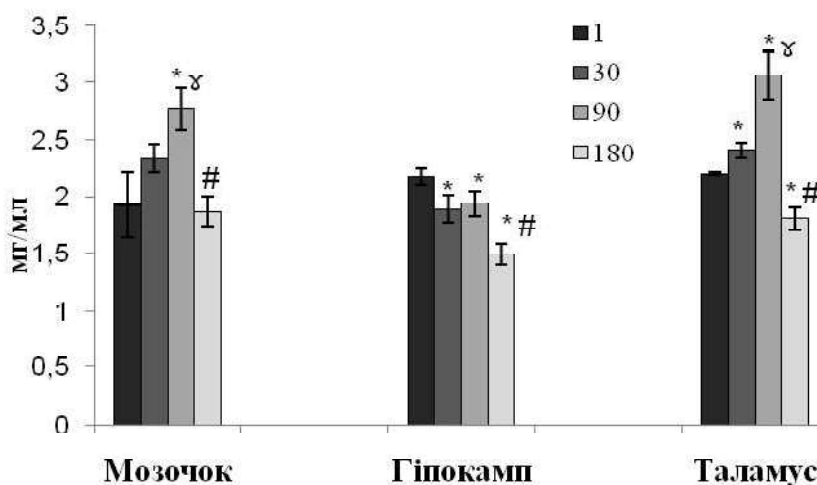


Рисунок 1. Загальний вміст білків у цитозольних фракціях, що отримані з різних відділів головного мозку щурів у процесі постнатального розвитку (1, 30, 90 та 180 днів)

n=6, * - вірогідність відмінностей P<0,05 порівняно з 1 днем; γ - P< 0,05 відносно 30 днів; # - P<0,05 відносно 90 днів

тварин у процесі розвитку до 90 днів: у мозочку - до $2,77 \pm 0,19$ мг/мл, таламусі - до $3,07 \pm 0,21$ мг/мл, а на 180 добу постнатального розвитку встановлено значне зменшення рівня загального вмісту білків порівняно з 90 денними тваринами. У гіпокампі визначений інший характер динаміки загального вмісту білків: зменшення на 30 добу до $1,89 \pm 0,12$ мг/мл, та на 180 добу - до $1,49 \pm 0,09$ мг/мл порівняно з новонародженими.

Процеси старіння мозку безпосередньо пов'язані з процесами демієлінізації, результатом яких є зменшення кількості мієліну. Основний білок мієліну становить приблизно 30 % мієлінової оболонки ЦНС. Під час руйнування мієлінової оболонки відбувається вивільнення ОБМ і наявність його у спинномозковій рідині - один з найбільш достовірних показників демієлінізації, причому рівень ОБМ знаходиться в прямій залежності від ступеня деструкції мієліну.

За результатом наших досліджень, у новонароджених (1-денних) шурів зазначено незначну кількість досліджуваного білка, оскільки процеси мієлінізації нервових волокон розпочинаються лише після народження,

тому рівень ОБМ у цей період мінімальний (рис. 2).

Згідно з отриманими результатами, концентрація ОБМ значно збільшується впродовж першого місяця розвитку тварин. У мозочку 30 денних шурів концентрацію основного білка мієліну зазначено на рівні $4,56 \pm 0,28$ мкг/100 мг тканини, у таламусі - $1,99 \pm 0,42$ мкг/100 мг тканини, у гіпокампі - $0,63 \pm 0,08$ мкг/100 мг тканини. На 90 день постнатального розвитку тварин встановлено стрімке збільшення рівня ОБМ у гіпокампі до $2,29 \pm 0,72$ мкг/100 мг тканини. Таке збільшення рівня досліджуваного білка пояснюється процесами швидкої мієлінізації нервових волокон у складі СА1- та СА3-зон гіпокампу. У таламусі встановлено лише тенденцію до збільшення рівня досліджуваного білка на 90 день розвитку, це вказує на те, що процеси мієлінізації у таламусі відбуваються повільно. Стосовно мозочка можна зробити висновок, що концентрація ОБМ у мозочку 30 денних шурів є найвищою серед інших відділів головного мозку. Це вказує на те, що одразу після народження тварин у мозочку процеси мієлінізації розпочинаються й досягають максимуму на 30-ту добу постнаталь-

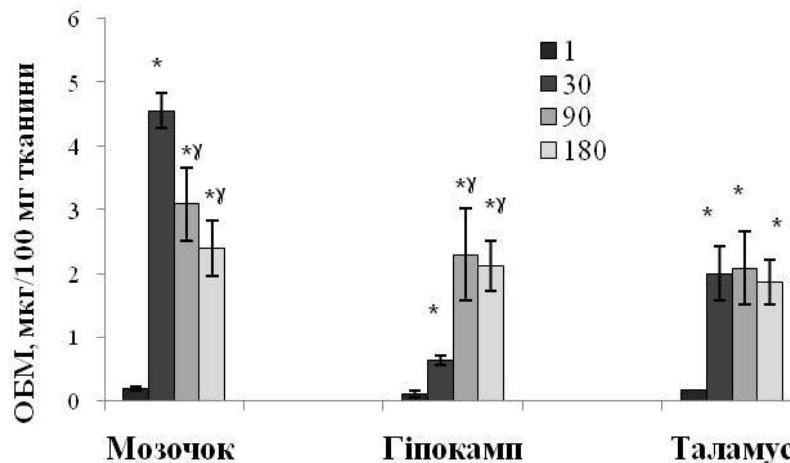


Рисунок 2. Вміст основного білка мієліну у різних відділах головного мозку шурів у процесі постнатального розвитку (1, 30, 90 та 180 днів)

n=6, * - вірогідність відмінностей $P < 0,05$ порівняно з 1 днем; γ - $P < 0,05$ відносно 30 днів

ного розвитку. Однак інтенсивність мієлінізації у мозочку дещо знижується на 90-ту добу постнатального розвитку до рівня $3,08 \pm 0,57$ мкг/100 мг тканини, що пов'язано з частковою демієлінізацією аксонів білої речовини мозочка. Вміст основного білка мієліну на 180 днів постнатального розвитку має тенденцію до зменшення у всіх досліджуваних відділах головного мозку гризунів. Проте цей процес є зворотнім, тому на пізніших етапах розвитку за створення оптимальних умов концентрація ОБМ може відновлюватися.

Висновки

Кількісні показники основного білка мієліну впродовж постнатального розвитку мають специфіку залежно від відділу мозку та терміну формування мієлінової оболонки під час онтогенезу нервової системи шурів.

1. Загальний пул цитозольних білків у мозочку та таламусі шурів поступово зростає до 90 днів постнатального розвитку й потім починає знижуватися, тоді як у гіпокампі цей показник поступово знижується впродовж життя.

довж життя.

2. Вміст основного білка мієліну у мозочку та таламусі шурів досягає максимального рівня на 30 добу постнатального розвитку, у гіпокампі - на 90. У мозочку шурів зниження ОБМ прогресує з 90 до 180 п.р., тоді, як у гіпокампі та таламусі вміст цього білка залишається стабільним.

Перспективи подальших досліджень

Отримані результати й сформульовані на їх підставі висновки істотно доповнюють сучасні уявлення про функціональні характеристики мієліну нервової тканини. Одержана інформація також може допомогти в розумінні механізмів виникнення і пошуку засобів запобігання розвитку процесів демієлінізації протягом старіння.

Список літератури

1. Bothwell M. Mechanisms and Medicines for Remyelination. *Annu Rev Med.* 2017;68:431-43. doi: 10.1146/annurev-med-050715-104400

2.Kazakova NA, Li H, Mora A, Jessen KR, Mirsky R, Richardson WD, et al. A screen for mutations in zebrafish that affect myelin gene expression in Schwann cells and oligodendrocytes. *Dev Biol.* 2006;297(1):1-13. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.03.020

3.Hong S, Remacle AG, Shiryayev SA, Choi W, Hullugundi SK, Dolkas J, et al. Reciprocal relationship between membrane type 1 matrix metalloproteinase and the algescic peptides of myelin basic protein contributes to chronic neuropathic pain. *Brain Behav Immun.* 2017;60:282-92. doi: 10.1016/j.bbi.2016.11.003

4.Xu W, Sachewsky N, Azimi A, Hung M, Gappasov A, Morshead CM. Myelin Basic Protein Regulates Primitive and Definitive Neural Stem Cell Proliferation from the Adult Spinal Cord. *Stem Cells.* 2017;35(2):485-96. doi: 10.1002/stem.2488

5.Chiba T, Otani Y, Yamaguchi Y, Ishibashi T, Hayashi A, Tanaka KF, et al. Microglial phospholipase D4 deficiency influences myelination during brain development. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2016;92(7):237-54. doi: 10.2183/pjab.92.237

6. Gleich O, Kadow C, Strutz J. The postnatal growth of cochlear nucleus subdivisions and neuronal somata of the anteroventral cochlear nucleus in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Audiol Neurootol.* 1998;3(1):1-20. doi: 10.1159/000013775

7.Bartzokis G., Lu P.H., Tishler T.A, Fong SM, Oluwadara B, Finn JP, et al. Myelin breakdown and iron changes in Huntington's disease: pathogenesis and treatment implications. *Neurochem Res.* 2007;32(10):1655-64. doi: 10.1007/s11064-007-9352-7

8.Етика лікаря та права людини: положення про використання тварин у біомедичних дослідках. Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія. 2003;22(2):108-9.

9.Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

10.Нго ТТ, Ленхофф ГМ, Яклич А. Иммуноферментный анализ. Москва: Мир; 1998. 444 с.

References

1.Bothwell M. Mechanisms and Medicines for Remyelination.

Annu Rev Med. 2017;68:431-43. doi:10.1146/annurev-med-050715-104400

2.Kazakova NA, Li H, Mora A, Jessen KR, Mirsky R, Richardson WD, et al. A screen for mutations in zebrafish that affect myelin gene expression in Schwann cells and oligodendrocytes. *Dev Biol.* 2006;297(1):1-13. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.03.020

3.Hong S, Remacle AG, Shiryayev SA, Choi W, Hullugundi SK, Dolkas J, et al. Reciprocal relationship between membrane type 1 matrix metalloproteinase and the algescic peptides of myelin basic protein contributes to chronic neuropathic pain. *Brain Behav Immun.* 2017;60:282-92. doi: 10.1016/j.bbi.2016.11.003

4.Xu W, Sachewsky N, Azimi A, Hung M, Gappasov A, Morshead CM. Myelin Basic Protein Regulates Primitive and Definitive Neural Stem Cell Proliferation from the Adult Spinal Cord. *Stem Cells.* 2017;35(2):485-96. doi: 10.1002/stem.2488

5.Chiba T, Otani Y, Yamaguchi Y, Ishibashi T, Hayashi A, Tanaka KF, et al. Microglial phospholipase D4 deficiency influences myelination during brain development. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2016;92(7):237-54. doi: 10.2183/pjab.92.237

6.Gleich O, Kadow C, Strutz J. The postnatal growth of cochlear nucleus subdivisions and neuronal somata of the anteroventral cochlear nucleus in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Audiol Neurootol.* 1998;3(1):1-20. doi: 10.1159/000013775

7.Bartzokis G., Lu P.H., Tishler T.A, Fong SM, Oluwadara B, Finn JP, et al. Myelin breakdown and iron changes in Huntington's disease: pathogenesis and treatment implications. *Neurochem Res.* 2007;32(10):1655-64. doi: 10.1007/s11064-007-9352-7

8.Етика лікаря та права людини: положення про використання тварин у біомедичних дослідках [Doctor Ethics and Human Rights: Provisions on the use of animals in biomedical experiments]. *Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry.* 2003;22(2):108-9. (in Ukrainian).

9.Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

10.Ngo TT, Lenkhoff GM, Yaklich A. Иммуноферментный анализ [Immunoenzyme analysis]. Moscow: Mir; 1998. 444 с. (in Russian).

Відомості про авторів:

Ковальчук Ю.П. - к.біол. н., науковий співробітник Науково-дослідного інституту біології Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара, м. Дніпро

Ушакова Г.О. - д. біол. н., професор кафедри біофізики та біохімії Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара

Сведения об авторах:

Ковальчук Ю.П. - к. биол. н., научный сотрудник Научно-исследовательского института биологии Днепропетровского национального университета имени Олеся Гончара

Ушакова Г.А. - д. биол. н., профессор кафедры биофизики и биохимии Днепропетровского национального университета имени Олеся Гончара

Information about authors:

Kovalchuk Y.P. - PhD, Researcher of the Research Institute of Biology of the Oles Honchar Dnipro National University

Ushakova G.A. - Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Biophysics and Biochemistry of the Oles Honchar Dnipro National University

Стаття надійшла до редакції 15.06.2018

Рецензент – проф. П. С. Булик

© Ю.П.Ковальчук, Г.О.Ушакова, 2018