

УДК 572.524.3: 611.018+576.54+57.053
doi:10.22494/cot.v5i1.69

Морфофункціональна характеристика культивованих клітин, виділених з нігтьового органу миші



Калмикова О. О.^{1,2}, Устименко А. М.¹, Луценко Т. М.¹, Клименко П. П.¹, Кирик В. М.¹

¹ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини Національної академії медичних наук України», Київ, Україна
²ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

e-mail: olesyakalmukova@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Нігтьовий орган є складною анатомічною структурою, яка здатна до росту та швидкої регенерації протягом усього життя організму. Такий значний відновлювальний потенціал пов'язують з наявністю в ньому стовбурових та прогеніторних клітин різного типу, біологія яких залишається одним із відкритих на сьогодні фундаментальних питань. Враховуючи активні пошуки нових джерел стовбурових клітин для клітинної терапії, актуальним є розгляд нігтьової одиниці як потенційного місця локалізації малодиференційованих клітин з стовбуровим потенціалом.

МЕТА. Дослідження було спрямоване на встановлення морфологічних, морфометричних та проліферативних характеристик культивованих клітин, виділених з нігтьового органу миші.

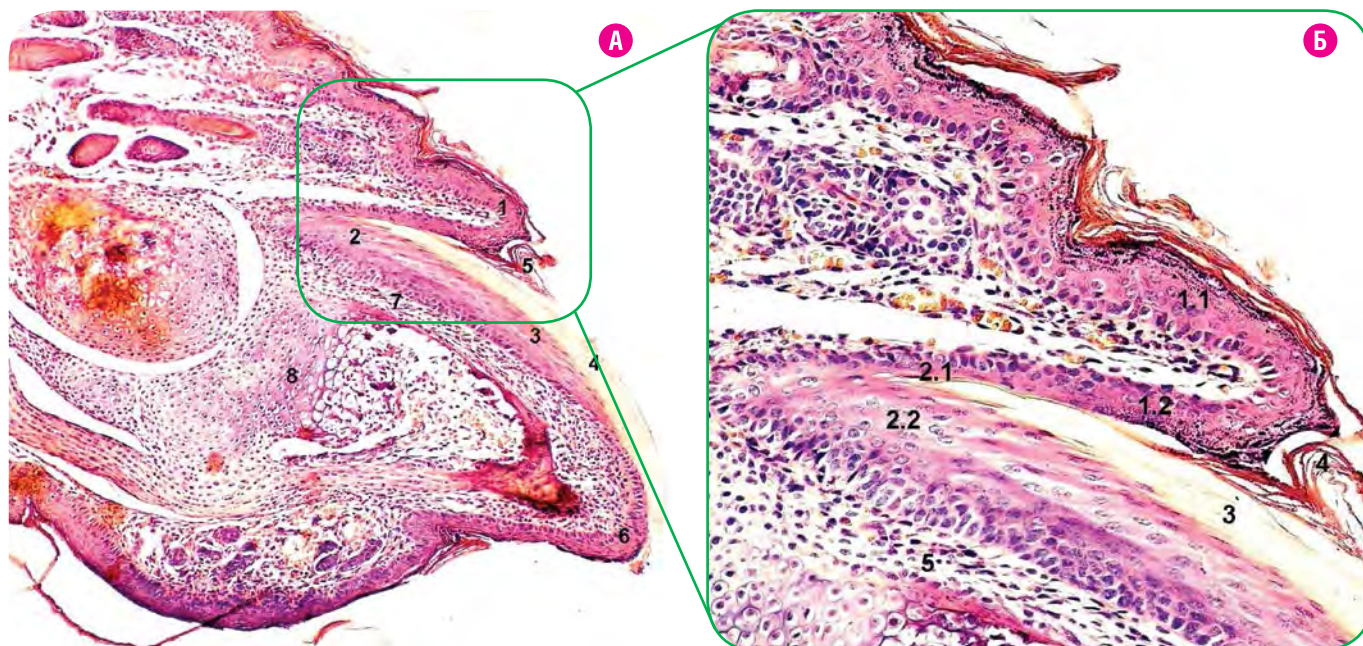
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Отримано первинні культури клітин з біоптатів, що включали області проксимальної нігтьової складки, матриксу та оніходермісу нігтьового органу мишей лінії FVB. Клітини культивували в середовищі DMEM:F12 з 15 % ембріональної сироватки корів протягом 6 пасажів. Визначали колонієутворюючу активність, швидкість подвоєння популяції, вимірювали площу клітин, ядер, розраховували ядерно-цитоплазматичний індекс. Для аналізу морфології клітин використовували фарбування гематоксиліном Бемера та еозинном, залізним гематоксиліном Генденгайна та барвником Май-Грюнвальда.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ. За даними морфологічного опису клітини з нігтьового органу мишей в культурі *in vitro* мають високу синтетичну активність та низьке ядерно-цитоплазматичне співвідношення – риси, характерні для малодиференційованих клітин. Час подвоєння популяції культури в середньому становив $80 \pm 6,5$ годин, найшвидше клітини росли на 4-му пасажі (63 ± 7 годин). Питома швидкість приросту культури в загальному є низькою ($0,01 \pm 0,0007$).

Ефективність колонієутворення на 5-му пасажі складала лише 4 %. Значна кількість колоній була малого розміру з великими проліферативно малоактивними клітинами, що може свідчити про виділення значної частини проміжних прогеніторних клітин.

ВИСНОВКИ. Отримана культура клітин нігтьового органу за даними аналізу їх морфології, морфометрії та проліферативного потенціалу є досить гетерогенною і потребує подальшої розробки та застосування технологій селективного культивування для детальної характеристики окремих її субпопуляцій.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: нігтьовий орган; нігтьовий матрикс; оніходерміс; культура клітин; тест на клоногенність



Травматична ампутація дистальних фаланг пальців є найбільш поширеним типом пошкодження руки у людини [1]. Фаланги пальців деяких ссавців (в тому числі мишей) можуть частково відновлюватися після пошкодження, в той час як регенерація всієї кінцівки у ссавців не відбувається [2]. Припускають, що саме наявність нігтя забезпечує ріст втраченої дистальної частини пальця [3].

Нігтьовий орган – складна структурно-функціональна одиниця [4], яка знаходиться на дорзальній стороні дистальної фаланги пальця та складається з багатьох типів клітин, більшість з яких є епітеліального походження: епітеліоцити (гіпоніхій, кутикула), кератиноцити (вентральний нігтьовий матрикс), меланоцити, клітини Меркеля, імунні клітини Лангерганса [5], оніхофібробласти [6, 7], стовбурові клітини нігтя [8]. Захисна функція нігтьового органу забезпечується за рахунок формування висококератинізованої нігтьової пластинки, яка росте протягом всього життя. Таке безперервне оновлення зумовлене функціонуванням стовбурових клітин нігтя, біологія яких досі є маловивченою. Відкритими питаннями залишаються їх локалізація та походження [11, 12, 13].

Як відомо, ектодермальні придатки шкіри у ссавців (волосся, нігті, копита, роги, зуби) розвиваються з епітелію та нервового гребеня (похідні ектодерми [14-16]) або мезенхіми (похідні мезодерми [17]). Присутність малодиференційованих клітин з високим проліферативним потенціалом продемонстрована в дистальній та проксимальній частині нігтьового матриксу [9, 10], вентральній проксимальній нігтьовій складці [8] та оніходермісі [11, 12, 13]. Серед придатків шкіри найбільш подібним за структурою до нігтьового органу є волоссяний фолікул. Аналогічними за своїми функціями вважають волосяну цибулину та нігтьовий матрикс, волоссяний стрижень та нігтьову пластинку [18]. У волоссяному фолікулі виявлена зона розташування пулу малодиференційованих стовбурових клітин (bulge), що є похідними нервового гребня [19, 20], проте пошуки такої ділянки в нігтьовому органі ще тривають.

Дослідження стовбурових клітин нігтя має велике значення як в фундаментальному, так і в прикладному аспекті, оскільки пошук нових джерел стовбурових клітин для клітинної терапії є актуальним на сьогодні завданням. Крім того, вивчення регуляторних шляхів взаємодії різних типів клітин (кератиноцитів, меланоцитів, епітеліоцитів, малодиференційованих прогеніторів) нігтьової одиниці дозволить детальніше розкрити механізми патогенезу таких дерматологічних захворювань, як вітіліго [21], псоріаз [22, 23] та ін. Відомо, що прояви цих хвороб часто асоційовані зі змінами нігтів, що може мати важливе діагностичне значення, а також дозволить розробити нові методи терапії через впливи на сигнальні каскади клітин.

Рис. 1. Мікрофотографія оглядового гістологічного фарбування поздовжнього зрізу нігтьового органу дорослої миші (гематоксилін-еозин, А – $\times 40$, Б – $\times 100$):

А) 1 – проксимальна нігтьова складка (ПНС); 2 – нігтьовий матрикс (НМ); 3 – нігтьове ложе; 4 – нігтьова пластинка; 5 – кутикула; 6 – гіпоніхій; 7 – оніходерміс; 8 – дистальна фаланга.

Б) 1.1 – дорзальна частина ПНС; 1.2 – вентральна частина ПНС; 2.1 – дорзальна частина НМ; 2.2 – вентральна частина НМ; 3 – нігтьова пластинка; 4 – кутикула; 5 – оніходерміс.

Метою даної роботи було встановлення морфології, морфометричних показників, здатності до самовідновлення та проліферативного потенціалу культивованих клітин, виділених з нігтьового органу миші.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Усі експерименти на тваринах виконані з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (European convention, Strasburg, 1986 р.), статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорсткого поводження» (№3447-IV, від 21.02.2006 р.), а також усіх норм біоетики та біологічної безпеки.

Дослідження були виконані на клітинних культурах, отриманих від мишей лінії FVB-C-Tg(GFPU)5Nagy/J, трансгенних за геном зеленого флуоресцентного білка (GFP), віком 6-7 днів. Миші утримувались в стандартних умовах віварію ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН» з вільним доступом до води та їжі.

Отримання та культивування клітин з нігтьового органу миші. Культуру клітин з нігтьового органу (КНО) миші отримували з експлантатів тканин, що включали вентральну частину проксимальної нігтьової складки (рис. 1Б-1.2), оніходерміс (рис. 1А-7, 1Б-5), дорзальну (рис. 1Б-2.1) та вентральну (рис. 1Б-2.2) частини нігтьового матриксу (рис. 1). Зазначену ділянку виділяли з нігтьового органу мишей в стерильних умовах під бінокулярним стереоскопічним мікроскопом МБС-10. Експлантати культивували в чашках Петрі діаметром 35 мм в середовищі DMEM:F12 (Sigma, США) з додаванням 15 % фетальної бичачої сироватки – FBS (Sigma, США) та 40 мкг/мл

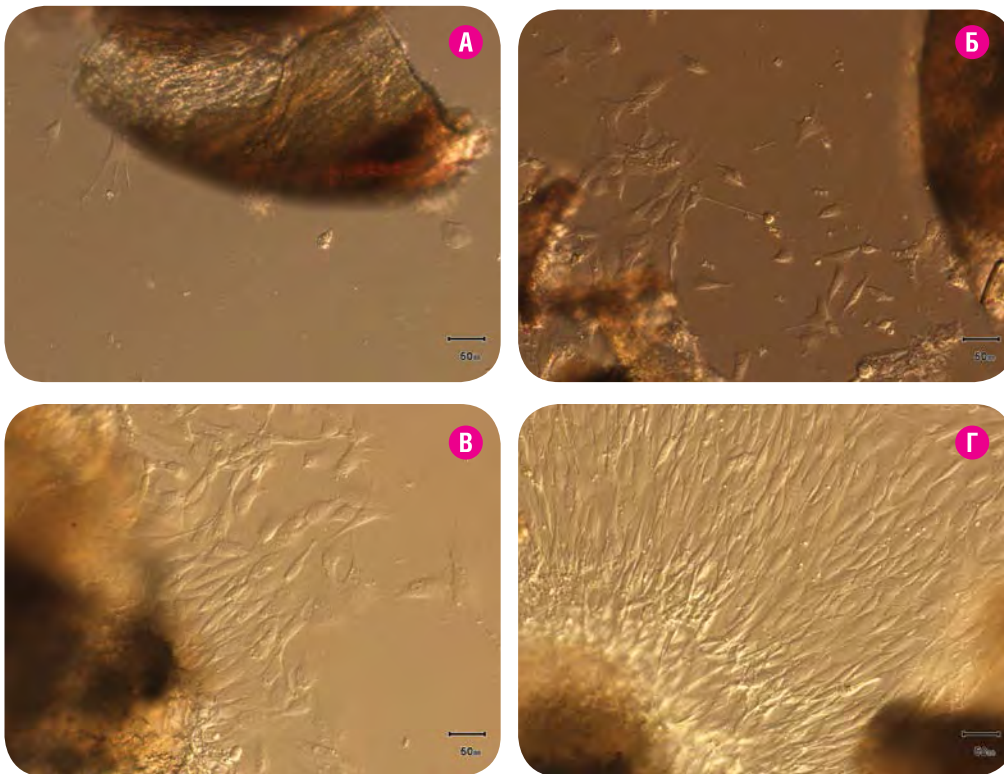


Рис. 2. Мікрофотографії культур клітин з експлантату нігтьового органу миші (x40, фазово-контрастна мікроскопія): А – 3-я доба культивування; Б – 6-а доба культивування; В – 9-а доба культивування; Г – 12-а доба культивування.

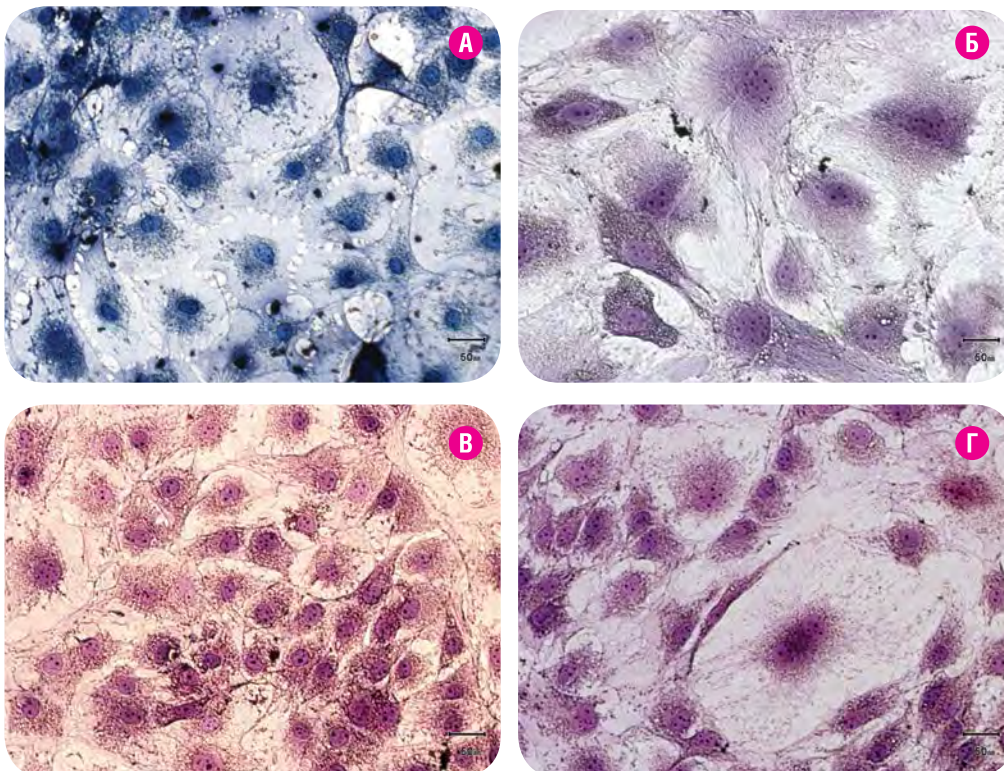


Рис. 3. Мікрофотографії культур КНО миші, оглядове забарвлення (x100): А – залізним гематоксилином Генденгайна (пасаж 2); Б – барвником Май-Грюнвальда (пасаж 2); В – гематоксилином Бемера та еозином (пасаж 1); Г – гематоксилином Бемера та еозином (пасаж 4).

пеніциліну/стрептоміцину в CO₂ інкубаторі Thermo 150 (Thermo, США) при 37 °С, 95 % вологості та 5 % CO₂. Пересівання первинної культури здійснювали на 14-ту добу культивування, подальше субкультивування проводили при досягненні конфлюентності.

Оглядове фарбування та морфометричний аналіз. Після видалення культурального середовища культуру клітин промивали

фосфатним буферним розчином (PBS) та фіксували 96 % етанолом 20 хвилин. Для проведення морфологічного аналізу клітини фарбували барвником Май-Грюнвальда (азур-еозином) протягом 20 хвилин.

Для характеристики відростків клітини та цитоскелету культуру фарбували залізним гематоксилином Генденгайна: після фіксації препарати промивали PBS, протравлювали 2,5 % залізо-амонійним галуном 10 хвилин при 37 °С в термостаті, після чого фарбували за-

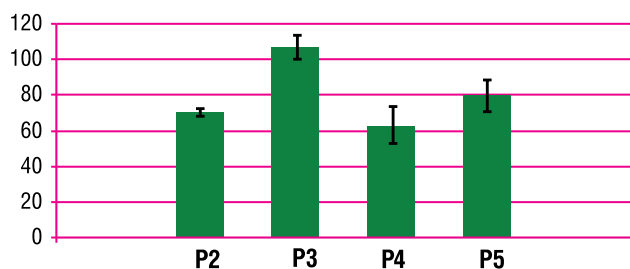
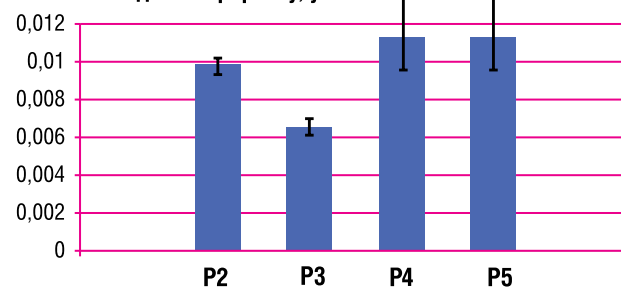
**час подвоєння
популяції, год****А****Питома швидкість приросту, у.о.****Б**

Рис. 4. Гістограми динаміки зміни часу подвоєння популяції (А) та питомої швидкості приросту (Б) культури КНО на 2-му, 3-му, 4-му та 5-му пасажах.

лізним гематоксиліном Генденгайна 10 хвилин при 37 °С в термостаті та промивали в PBS і в проточній воді.

Для проведення морфометричного аналізу (підррахунок кількості ядерець, площі ядра, клітини та ядерно-цитоплазматичного співвідношення – ЯЦС) застосовували оглядове фарбування гематоксиліном Бемера та еозинном, який надає яскравий контраст і чітко відмежовує цитоплазму від ядра. Зафіксовані та висушені клітини фарбували гематоксиліном Бемера 5-10 хв, потім 10-15 хв тримали в проточній воді, після чого їх дофарбовували еозинном 3 хв.

Прижиттєву мікроскопію та аналіз цитологічних препаратів проводили з використанням інвертованого флуоресцентного мікроскопа IX 71 (Olympus, Японія), з цифровою камерою DP-20 та програмним забезпеченням QucikPHOTO MICRO (Promicra, Чехія). Морфометричний аналіз проводили на цифрових мікрофотографіях за допомогою програми ImageJ 1.45 (National Institutes of Health, США).

Проліферативний потенціал та здатність до самовідновлення.

Клітини, починаючи з 2-го пасажу, висівали в кількості $12 \cdot 10^4$ на чашку Петрі діаметром 35 мм (щільність $12,5 \cdot 10^3$ клітин на 1 см^2) та культивували в середовищі DMEM:F12 при 5 % CO_2 впродовж семи днів. Заміну середовища проводили кожні 48 годин. Клітини знімали за допомогою 0,25 % розчину трипсину з ЕДТА (Sigma, США) та проводили підррахунок клітин в камері Горяєва. Розраховували час подвоєння популяції та питому швидкість приросту за стандартними формулами [24].

Для проведення тесту на клоногенність (підррахунок колонієутворюючих одиниць) використовували метод серійного розведення в 96-лунковому планшеті з початковою концентрацією $2 \cdot 10^4$ клітин/мл або $4 \cdot 10^3$ клітин в першу лунку (200 мкл), яку в кінцевому рахунку доводили до розведення в 1 клітину на лунку [25]. Фінальна найбільша кількість клітин в лунці становила $1 \cdot 10^3$, яка зменшувалась в геометричній прогресії до 1. Після 10 днів культивування клітини фіксували 4 % розчином параформу та фарбували барвником Май-Грюнвальда.

Статистичний аналіз. Статистичний аналіз одержаних результатів дослідження проводили з використанням програмного забезпечення Statistica (StatSoft, США) та MS Excel (Microsoft, США). Морфометричні показники підрраховували в програмі ImageJ. Отримані результати представлені у вигляді $M \pm m$ (середнє значення \pm стандартна похибка середнього).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На 3-4-ту добу культивування з експлантатів нігтьового органу починалась міграція та активна проліферація фібробластоподібних клітин (рис. 2). Культура КНО досягала конфлюентного моношару вже на 14-ту добу культивування. Більшість клітин мали фібробластоподібну морфологію з біполярно розташованими відростками, проте зустрічалися добре розпластані клітини полігональної форми без відростків, а також округлі неприкріплені клітини.

ОГЛЯДОВЕ ФАРБУВАННЯ ТА МОРФОМЕТРИЧНИЙ АНАЛІЗ

Отримані в культурі клітини з нігтьового органу характеризуються ядром правильної округлої форми за наявності декількох чітко окреслених ядерець (рис. 3). Після фарбування різними методами в навколоядерній цитоплазмі багатьох клітин відмічається присутність дрібнодисперсної зернистості – ознака добре розвинутого гранулярного ендоплазматичного ретикулому та активного білкового синтезу. За формою зустрічаються округлі, полігональні та витягнуті з довгими біполярно розміщеними відростками клітини. Така гетерогенність клітин за формою також була відмічена у інших попередніх дослідженнях при культивуванні нігтьового матриксу людини – описана полігональна та веретеноподібна морфологія клітин [26]. Всі клітини мають численні короткі та тонкі відростки, більшість з яких утворюють контакти з сусідніми клітинами.

Отримані морфометричні дані (табл. 1) показали збільшення площі клітин в 4,5 разу та ядра в 4 рази при наступних пасажах (порівняння проводилось на 1-му і 4-му пасажах). Проте це збільшення не є пропорційним, оскільки ядерно-цитоплазматичне співвідношення на даних пасажах не змінювалось та залишалось стабільно низьким і в середньому становило $0,071 \pm 0,01$. Причому такі дані щодо низького значення ЯЦС узгоджуються з результатами іншого дослідження з культивування клітин нігтьового матриксу людини, де окрім низького ЯЦС за допомогою електронної мікроскопії було показано високий рівень еухроматину до гетерохроматину, що свідчить про високу активність процесів синтезу в ядрі [27]. В нашій роботі про значний рівень активації синтезу свідчить збільшена кількість ядерець – в середньому 4 на ядро проти 1-2 зазвичай.

**ПРОЛІФЕРАТИВНИЙ ПОТЕНЦІАЛ
ТА ЗДАТНІСТЬ ДО САМОВІДНОВЛЕННЯ**

Час подвоєння популяції культури КНО (рис. 4А) в середньому становив $80 \pm 6,5$ годин, причому найшвидше клітини росли на 4-му пасажі (63 ± 7 годин). Питома швидкість приросту культури КНО (рис. 4Б) в загальному є низькою ($0,01 \pm 0,0007$), що може бути пов'язано з отриманням культури КНО одразу з декількох анатомічних місць вірогідного розташування малодиференційованих клітин, а також з їх незначною кількістю в порівнянні з кількістю інших клітин.

Тест на клоногенність виконували на 5-му пасажі, що могло вплинути на ефективність колонієутворення, оскільки вона складала лише 4 % (рис. 5). Найбільша частота колоній ($33 \pm 3,6$ %) на 1 клітину зустрічалась при концентрації клітин 4 на лунку. Значна кількість ко-

Таблиця 1. Дані морфометричного аналізу культури КНО

ПАСАЖ	ПЛОЩА КЛІТИНИ (мкм ²)	ПЛОЩА ЯДРА (мкм ²)	ЯЦС	КІЛЬКІСТЬ ЯДЕРЕЦЬ
P1	1032 ± 61	62 ± 3	0,078 ± 0,004	4 ± 0,2
P4	5235 ± 595	239 ± 13,5	0,065 ± 0,003	3 ± 0,2

лоній була малої розміру з великими проліферативно малоактивними клітинами, що може свідчити про виділення значної частини проміжних прогеніторних клітин.

Загалом, представлені дані морфологічного та морфометричного аналізу первинних культур клітин з нігтьового органу миші є лише початковим етапом подальшого більш детального та ґрунтового дослідження даного типу клітин. Неоднорідність клітинної популяції *in vitro* підтверджує складність гістологічної будови нігтьової одиниці та присутність в ній багатьох типів клітин, які можуть відрізнятися за морфологічними характеристиками, проліферативною активністю, експресією поверхневих і внутрішньоклітинних маркерів, відповідальних за міжклітинну взаємодію та реалізацію специфічних функцій, в тому числі і відновлювального потенціалу [29, 30]. Тому актуальним залишається також питання отримання ізольованих культур клітин, виділених з окремих анатомічних зон нігтьового органу, зокрема з області проксимальної нігтьової складки, нігтьового матриксу та оніходермісу.

Частота колоній на 1 клітину, %

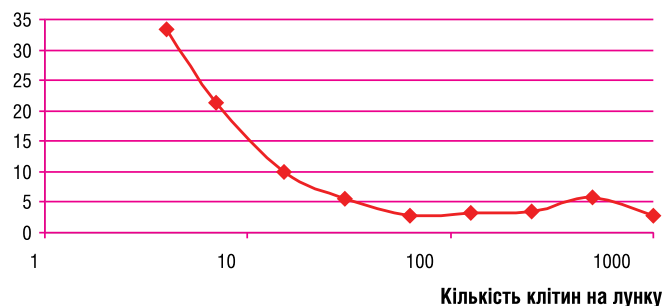


Рис. 5. Гістограма результатів тесту на клоногенність культури КНО на 5-му пасажі.

ВИСНОВКИ

Отримана культура клітин нігтьового органу миші за даними аналізу їх морфології, морфометрії та проліферативного потенціалу є до гетерогенною і потребує подальшої розробки технологій селективного виділення та культивування для детальної характеристики окремих її субпопуляцій.

СПИСОК ЦИТОВАНИХ ДЖЕРЕЛ

- Acute traumatic occupational hand injuries: type, location, and severity / G. Sorock, D. Lombardi, R. Hauser, et al. // J Occup Environ Med. – 2002. – Vol. 44. – P. 345-351.
- Injuries to appendage extremities and digit tips: A clinical and cellular update / Y. Rinkevich, Z. Maan, G. Walmsley, et al. // Dev Dyn. – 2015. – Vol. 244, № 5. – P. 641-650.
- Lehoczky J. Are fingernails a key to unlocking the puzzle of mammalian limb regeneration? / J. Lehoczky // Experimental Dermatol. – 2016. – doi: 10.1111/exd.13246
- Kalmukova O. O. Stem cells in nail unit of mammals / O. O. Kalmukova // Cell and Organ Transplantation. – 2016. – Vol. 4, № 1. – P. 138-143. doi: 10.22494/COT. V4I1.1.
- Immunology of the human nail apparatus: the nail matrix is a site of relative immune privilege / T. Ito, N. Ito, M. Saathoff, et al. // J Invest Dermatol. – 2005. – Vol. 125. – P. 1139-1148.
- Sellheyer K. The concept of the onychodermis (specialized nail mesenchyme): an embryological assessment and a comparative analysis with the hair follicle / K. Sellheyer, P. Nelson // J Cutan Pathol. – 2013. – Vol. 40. – P. 463-471.
- CD10, a marker for specialized mesenchymal cells (onychofibroblasts) in the nail unit / K. J. Lee, W. S. Kim, J. H. Lee, et al. // J Dermatol Sci. – 2006. – Vol. 42. – P. 65-67.
- Sellheyer K. Nail stem cells / K. Sellheyer // JDDG. – 2013. – Vol. 1103. – P. 235-239.
- Nakamura M. The localization of label-retaining cells in mouse nails / M. Nakamura, O. Ishikawa // J Invest Dermatol. – 2008. – Vol. 128. – P. 728-730.
- Wnt activation in nail epithelium couples nail growth to digit regeneration / M. Takeo, W. Chou, Q. Sun, et al. // Nature. – 2013. – Vol. 499. – P. 228-232.
- The presence and localization of onychodermis (specialized nail mesenchyme) containing onychofibroblasts in the nail unit: a morphological and immunohistochemical study / D. Y. Lee, J. H. Park, H. T. Shin, et al. // Histopathology. – 2012. – Vol. 61, № 1. – P. 123-130.
- Onychodermis (specialized nail mesenchyme) is present in ectopic nails / J. H. Park, J. H. Kim, J. H. Lee, et al. // J Cutan Pathol. – 2013. – Vol. 40. – P. 600-602.
- Perrin C. The nail dermis: from microanatomy to constitutive modelling / C. Perrin // Histopathology. – 2015. – Vol. 66, № 6. – P. 864-872.
- Naveau A. Tooth, hair and claw: comparing epithelial stem cell niches of ectodermal appendages / A. Naveau, K. Seidel, O. D. Klein // Experimental cell research. – 2014. – Vol. 325, № 2. – P. 96-103.
- Neural crest stem cell-specific deletion of the Pygopus2 gene modulates hair follicle development / A. Narytnyk, K. Gillinder, B. Verdon, et al. // Stem Cell Reviews and Reports. – 2014. – Vol. 10, № 1. – P. 60-68.
- Dual epithelial origin of vertebrate oral teeth / V. Soukup, H. H. Epperlein, I. Horacek, et al. // Nature. – 2008. – Vol. 455, № 7214. – P. 795-798.
- Induction of hard keratin expression in non-nail-matrix keratinocytes by nail-matrix fibroblasts through epithelial-mesenchymal interactions / M. Okazaki, K. Yoshimura, H. Fujiwara, et al. // Plastic and reconstructive surgery. – 2003. – Vol. 111, № 1. – P. 286-290.
- Achten G. Normale Histologie und Histochemie des Nagels / G. Achten // In: Jadassohn J: Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten, Bd 1. Berlin: Springer, 1968. – P. 339-76.
- Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle / M. Sieber-Blum, M. Grim, Y. F. Hu, et al. // Developmental Dynamics. – 2004. – Vol. 231, № 2. – P. 258-269.
- A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells / K. J. Fernandes, I. A. McKenzie, P. Mill, et al. // Nature cell biology. – 2004. – Vol. 6, № 11. – P. 1082-1093.
- Clinical study of nail changes in vitiligo / T. Anbar, R. A. Hay, A. T. Abdel-Rahman, et al. // Journal of cosmetic dermatology. – 2013. – Vol. 12, № 1. – P. 67-72.

22. Splinter hemorrhages of the nails: a systematic review of clinical features and associated conditions / R. Haber, R. Khoury, E. Kechichian, et al. // International Journal of Dermatology. – 2016. – Vol. 55, № 12. – P. 1304-1310.
23. Nail psoriasis: a review of the literature / K. R. Schons, C. F. Knob, N. Murussi, et al. // An Bras Dermatol. – 2014. – Vol. 89, № 2. – P. 312-317.
24. Режим доступу: <http://www.doubling-time.com/compute.php>
25. Cell cloning by serial dilution in 96 well plates, protocol. John A. Ryan. Corning. – Режим доступу: http://www.level.com.tw/html/ezcatfiles/vipweb20/img/img/34963/3-2Single_cell_cloning_protocol.pdf
26. Kitahara T. Cultured nail keratinocytes express hard keratins characteristic of nail and hair *in vivo* / T. Kitahara, H. Ogawa // Arch Dermatol Res. – 1992. – Vol. 284, № 4. – P. 253-256.
27. Characterization of cultured nail matrix cells / M. Picardo, A. Tosti, C. Marchese, et al. // J Am Acad Dermatol. – 1994. – Vol. 30. – P. 434-440.
28. CD44 is a negative cell surface marker for pluripotent stem cell identification during human fibroblast reprogramming / R. H. Jr. Quintanilla, J. S. Asprer, C. Vaz, et al. // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 1. – P. e85419.
29. Курык В. Cultivation of cells with stem potential from nail matrix / В. Курык, О. Кучук, Г. Бутенко // Abstracts of the World Conference on Regenerative Medicine, November 2-4, 2011, Leipzig, Germany. – Regenerative Medicine. – 2011. – Vol. 6, № 6, Suppl. 2. – P. 216-217.
30. Germ-layer and lineage-restricted stem/progenitors regenerate the mouse digit tip / Y. Rinkevich, P. Lindau, H. Ueno, et al. // Nature. – 2011. – Vol. 476, № 7361. – P. 409-413.



СТАТТЯ НА САЙТІ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори підтверджують відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 14.04.2017 р.

Прийнята до друку 22.05.2017 р.