HAL
open science

Імуногістохімічна експресія проміжних філаментів у діагностиці дифузних гліом Імуногістохімічна експресія проміжних філаментів у діагностиці дифузних гліом

T.V. Shynkarenko

▶ **To cite this version:**

T.V. Shynkarenko. Імуногістохімічна експресія проміжних філаментів у діагностиці дифузних гліом Імуногістохімічна експресія проміжних філаментів у діагностиці дифузних гліом . Medical perspectives (Medicni Perspektivi), 2017, 22 (3), pp.93-98. ⟨10.26641/2307-0404.2017.3.111932⟩. ⟨hal-01626841⟩

HAL Id: hal-01626841

https://hal.science/hal-01626841v1

Submitted on 31 Oct 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

11. Wald E.R. Clinical practice guideline for the diagnosis and management of acute bacterial sinusitis in children aged 1 to 18 years / E.R. Wald, K.E. Applegate, C. Bordley // Pediatrics. – 2013. − Vol. 132. – P. e262-e280. doi: 10.1542/peds.2013-1071.

REFERENCES

1. Krivopustov CP. [Acute otitis media in children: the pediatrician's attitude]. Dityachiy likar. 2010;1:12-18. Russian.
2. Kryuchko TA, Shpekht TV, Tkachenko OYa. [Acute otitis media in children: contemporary views on the issue]. Zdorov'e rebenka. 2010;2(23):7-10. Russian.
3. Nesterova IV. [Problems of treatment of viral and bacterial infections in immune coppromised children with frequent respiratory infections]. Lechashchiy vrach. 2009;6:40-43. Russian.
4. Rebrova OY. [Statistical analysis of medical data. Application of STATISTICA software]. Moskva: Media Sfera; 2006. Russian.
5. Plesh IA, Kshanovskaya GI, Khomko OI, et al. [Modern possibilities of clinical laboratory diagnostics]. Bukovinskiy meditsinskiy vestnik. 2014;1(69):147-50. Ukrainian.
6. Shcheplyagina LA. [Age-dependent features of the immune system in children]. RMZh. 2009;23:1564. Russian.
7. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps. Rhinology. 2007;45(Suppl 20):84-85.
8. Lopez Campos X, Alvarez Castello M, Massip J. Risk factors for recurrent upper respiratory infections in preschool children. World Allergy Organ J. 2012;5(Suppl 2):S101. doi: 10.1097/01.WOX.0000412013.14727.54
9. Schroder JM, Harder J. Antimicrobial skin peptides and proteins. Cellular and Molecular Life Sciences. 2006;63:469-486. doi: 10.1007/s00018-005-5364-0
10. Lieberthal AS, Carroll AE, Chonmaitree T, et al. The diagnosis and management of acute otitis media. Pediatrics. 2013;131:e964-e999. doi: 10.1542/peds.2012-3488
11. Wald ER, Applegate KE, Bordley C. Clinical practice guideline for the diagnosis and management of acute bacterial sinusitis in children aged 1 to 18 years. Pediatrics. 2013;132:e262-e280. doi: 10.1542/peds.2013-1071

Стаття надійшла до редакції
11.08.2017

УДК 616.831-006-036:612.017 https://doi.org/10.26641/2307-0404.2017.3.111932

Т.В. Шинкаренко

ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ЕКСПРЕСІЯ ПРОМІЖНИХ ФІЛАМЕНТІВ У ДІАГНОСТИЦІ ДИФУЗНИХ ГЛІОМ

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»
кафедра патологічної анатомії і судової медицини
(зав. – к. мед. н., доц. О.А. Алєксєєнко)
вул. В. Вернадського, 9, Дніпро, 49044, Україна
SE «Dnipropetrovsk medical academy of Health Ministry of Ukraine»
V. Vernadsky str., 9, Dnipro, 49044, Ukraine
e-mail: Timash3061990@gmail.com

Ключові слова: *пухлина головного мозку, імуногістохімія, діагностика, віментин, GFAP*
Key words: *brain tumor, immunohistochemistry, diagnostics, vimentin, GFAP*

Реферат. Иммуногистохимическая экспрессия промежуточных филаментов в диагностике диффузных глиом. Шинкаренко Т.В. *Белки промежуточных филаментов играют важную роль в поддержании стабильной формы, а также возможного перемещения клеток, особенно неопластических. Работы, посвящённые*

изучению экспрессии данных белков в диффузных глиомах, немногочисленны и достаточно противоречивы. Авторы исследовали особенности экспрессии промежуточных филаментов (GFAP и виментина) в диффузних глиомах головного мозга. Было исследовано операционный материал 52 пациентов с диагнозом астроцитарных и олигодендроглиальных опухолей головного мозга. При иммуногистохимическом исследовании были использованы первичные антитела против GFAP, виментина, Ki-67. Вычисляли индекс пролиферации и удельную площадь экспрессируемых белков филаментов, используя пакет программного обеспечения ImageJ 1,47v. Статистическую значимость различия результатов в группах исследуемых опухолей было проверено с помощью точного теста Фишера. Большинство образцов с умеренной экспрессией GFAP (62,5%) относились к олигодендроглиальным опухолям. Часть олигодендроглиальных опухолей (58,3%) показала отсутствие экспрессии виментина опухолевыми клетками, что не наблюдали в астроцитомах. Для диффузных глиом свойственен высокий уровень экспрессии белков промежуточных филаментов - GFAP (100%) и виментина (87%). Уровень экспрессии GFAP и виментина выше в астроцитарных опухолях, чем в олигодендроглиальных (p<0,05). Интенсивность экспрессии GFAP и виментина существенно разнится в опухолях астроцитарного и олигодендроглиального типов, что позволяет использовать её как дифференциально-диагностический признак.

Absract. Immunohistochemical expression of intermediate filaments in diagnostics of diffuse gliomas. Shynkarenko T.V. *Intermediate filament proteins play an important role in maintaining a stable shape, as well as the possible movement of cells, including neoplastic cells. However there, are few works dedicated to the investigation of these proteins expression in diffuse gliomas and they are quite contradictory. The authors studied the expression of intermediate filaments (glial fibrillar acid protein GFAP, vimentin) in diffuse gliomas of the brain. 52 postoperative samples with the diagnosis of astrocytic and oligodendroglial brain tumors were examined. Primary antibodies against GFAP, vimentin, Ki-67 were used. The proliferative index and the expression area were calculated using the tools ImageJ 1.47v. The statistical Fisher test was included. Most samples with moderate expression of GFAP (62.5%) are rated to oligodendroglial tumors. Part of oligodendroglial tumors (58.3%) showed no expression of vimentin by tumor cells, this was not observed in astrocytomas. Meanwhile, a high level of expression of intermediate filament proteins - GFAP (100%) and vimentin (87%) is characteristic for diffuse gliomas. The expression level of GFAP and vimentin is higher in astrocytic tumors than in oligodendroglial (p<0.05). Levels of GFAP and vimentin expression are differential feature of astrocytic and oligodendroglial tumors.*

Дифузні гліоми – найчастіші первинні пухлини головного мозку – характеризуються значною морфологічною різноманітністю, що ускладнює патогістологічну діагностику. Гліомоцити (пухлинні клітини гліом) характеризуються синтезом проміжних філаментів, до складу яких входять молекули гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) та віментину, іноді – додатково нестину та сіменину [8].

Кількісно-якісний склад проміжних філаментів у гліальних клітинах впливає на їх функціонування: у мишей із вродженим дефіцитом GFAP та віментину знижується активність реактивних змін глії у відповідь на гострий і хронічний стрес [9], що може бути пояснено через їх вплив на рухливість клітин [6,7]. Попередні дослідження діагностичної цінності експресії проміжних філаментів у дифузних гліомах головного мозку були нечисленними й досить неоднозначними [10]. Тому метою цього дослідження було визначення діагностичної ролі особливостей експресії проміжних філаментів (GFAP, віментин) у дифузних гліомах головного мозку різного гістологічного типу та ступеня злоякісності.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Досліджено 52 дифузні гліоми пацієнтів нейрохірургічного відділення Дніпропетровської обласної клінічної лікарні ім. І.І. Мечникова (2010-2017 рр.). Пацієнти не отримували хіміо- чи радіотерапії до операції. Гістологічний діагноз був встановлений, спираючись на сучасні критерії [12]. У дослідження були включені 7 дифузних астроцитом (Grade II), 9 анапластичних астроцитом (Grade III), 24 гліобластоми (Grade IV), 7 олігодендрогліом (Grade II), 5 анапластичних олігодендрогліом (Grade III). Середній вік пацієнтів становив 43,12±11,20 року. Співвідношення чоловіків і жінок 1,08:1.

Імуногістохімічне дослідження проводилось згідно з протоколами компанії TermoScientific (TS), (США). Використано первинні антитіла GFAP (RTU (DakoCytomation, Данія)), віментину (клон sp20, р. 1:200 (TS,США)) та Ki-67 (клон sp6, р. 1:400 (TS,США)), що наносились на зрізи завтовшки 4 мкм із системою візуалізації Lab Vision Quanto (TS, США) та виявленням білкового ланцюга за допомогою DAB Quanto Chromogen (TS, США).

Морфометричний метод. Експресію проміжних філаментів визначали за локалізацією накопиченого білка в структурах пухлин (пухлинні клітини, судини, вогнища некрозу, кальцифікати), а також напівкількісно за рівнем накопичення у структурах неоплазії («-» відсутнє, «+/-» слабке, «+» помірне, «+/++» виражене, «++» максимальне накопичення) та інтенсивністю

експресії: «-» (<10% площі ділянок з максимальною інтенсивністю експресії), «+» (10-40% площі ділянки зрізу з найбільшою інтенсивністю експресії), «++» (коричневий колір займає >40% площі «гарячої ділянки»). Площа коричневого кольору визначалася за рахунок послідовних деконволюції, бінаризації, гістограми кольорів (ImageJ). Індекс проліферації (ІП) визначали за методикою, описаною раніше [2,3], як середнє значення співвідношення кількості Ki-67-імунореактивних ядер до загальної кількості пухлинних ядер у фотографіях зон новоутворення з найбільшим скупченням клітин, що проліферують.

Статистичний аналіз був проведений за допомогою програмного забезпечення DoctorStat (версія 1.9). Дані представлені у вигляді M±m, де M – середнє арифметичне значення, m – стандартна похибка середнього. Статистичну значущість відмінності результатів у групах досліджуваних пухлин було перевірено за допомогою точного тесту Фішера (2xN). Значення $p<0,05$ було прийнято статистично значущим [1].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Індекс проліферації пухлинних клітин у дифузних астроцитарних та олігодендрогліальних пухлинах головного мозку коливався від 0,9 до 32,6%, середнє значення становило 15,4±10,3 %. Найвищі значення ІП були зареєстровані у гліобластомах (18,8±8,4 %), найнижчі – у пухлинах, що належать до Grade II, – 3,6±2,1%. Анапластичні гліоми (Grade III) характеризувалися високими значеннями ІП, але поступалися гліобластомам (14,2±9,1). ІП<10% був властивий 21 пухлині (40,4%).

Локалізація та рівень накопичення проміжних філаментів у дифузних гліомах. У дифузних гліомах головного мозку астроцитарного та олігодендрогліального типів GFAP був присутнім у пухлинних клітинах, перинуклеарно, у відростках, а також у реактивних астроцитах периферії пухлини (табл. 1). Помірна експресія була властива гемістоцитарним неопластичним клітинам, а слабка – некротизованій тканині (гліобластом), багатоядерним та проліферуючим пухлинним клітинам. Серед GFAP-позитивних структур виділялися ядра, ендотелій і сполучна тканина судин, кальцифікати.

Максимальна експресія віментину у всіх зразках реєструвалася в ендотелії судин. Пухлинні клітини демонстрували помірне перинуклеарне та слабке забарвлення відростків. Помірна реакція була властива також для некротизованої тканини, багатоядерних та гемістоцитарних клітин.

Таблиця 1

Локалізація та рівні накопичення GFAP та віментину в окремих структурах дифузних гліом

Локалізація	GFAP	Віментин
Пухлинні клітини:		
інтрануклеарно	-	-
перинуклеарно	++	+
відростки	++	+/-
Ендотелій судин	-	++
Сполучна тканина судин	-	-
Реактивні астроцити (периферія пухлини)	++	+/-
Некротизована тканина	+	+
Багатоядерні клітини	+	+
Клітини з фігурами мітозу	+	+/-
Гемістоцити	+/++	+
Кальцифікати	-	-

Примітки: «-» відсутнє, «+/-» слабке, «+» помірне, «+/++» виражене, «++» максимальне накопичення протеїнів проміжних філаментів.

Інтенсивність експресії GFAP та віментину. Серед 52 дифузних гліальних пухлин 8 (15,4%) показали помірну експресію GFAP, решта – виражену (табл. 2). Помірна експресія була властива пухлинам пацієнтів жіночої статі (p= 0,133), пацієнтам старшим за 50 років (p=0,049). Рівень експресії GFAP був вище в пухлинах Grade IV, а також в пухлинах з більшою проліферативною активністю, проте статистичної значущості залежності від Grade пухлини (p=0,417) та ІП (p=1) виявлено не було. Більшість зразків з помірною експресією GFAP (62,5%) належали до олігодендрогліальних пухлин, p=0,011.

Таблиця 2

Взаємозв'язок між експресією проміжних філаментів та клініко-морфологічними характеристиками (n, %, p)

	n	GFAP		p	Віментин			p
		+	++		-	+	++	
Стать								
Чоловіча	**27**	**2 7,4%**	**25 92,6%**	**0,133**	**4 14,8%**	**11 40,8%**	**12 44,4%**	**1**
Жіноча	**25**	**6 24,0%**	**19 76,0%**		**3 12,0%**	**10 40,0%**	**12 48,%**	
Вік								
<50	**31**	**2 6,5%**	**29 93,5%**	**0,049***	**5 16,1%**	**10 32,2%**	**16 51,7%**	**0,424**
>50	**21**	**6 28,6%**	**15 71,4%**		**2 9,5%**	**11 52,4%**	**8 38,1%**	
ІП								
<10	**21**	**3 14,3%**	**18 85,7%**	**1**	**6 28,6%**	**9 42,8%**	**6 28,6%**	**0,012***
>10	**31**	**4 12,9%**	**27 87,1%**		**1 3,2%**	**12 38,7%**	**18 58,1%**	
Тип пухлини								
астроцитарний	**40**	**3 7,5%**	**37 92,5%**	**0,011***	**0**	**17 42,5%**	**23 57,5%**	**0***
олігодендрогліальний	**12**	**5 41,7%**	**7 58,3%**		**7 58,3%**	**4 33,3%**	**1 8,4%**	
Grade пухдини								
Grade II	**14**	**3 21,4%**	**11 78,6%**	**0,417**	**4 28,6%**	**9 64,3%**	**1 7,1%**	**1**
Grade III	**14**	**3 21,4%**	**11 78,6%**		**3 21,4%**	**9 64,3%**	**2 14,3%**	**0***
Grade IV	**24**	**2 8,3%**	**22 91,7%**		**0**	**3 14,3%**	**21 85,7%**	
Експресія GFAP								
+	**8**	-	-		**3 37,5%**	**4 50,0%**	**1 12,5%**	**0,031***
++	**44**	-	-		**4 9,1%**	**17 38,6%**	**23 52,3%**	
Всього	**52**	**8**	**44**		**7**	**21**	**24**	

Примітка. * – відмінність статистично значуща при p<0,05.

У дифузних гліомах переважно фіксували помірну (40,4%) і виражену (46,2%) експресію віментину. Рівень експресії не залежав від статі пацієнта (p=1), незначно частіше був вищим у більш старших пацієнтів (p=0,424). При рівних показниках пухлин, які були віднесені до Grade II і Grade III (p=1), більш виражена експресія була зареєстрована в гліобластомах (Grade IV), ніж в анапластичних астроцитомах та анапластичних олігодендрогліомах (Grade III), p=0. Відповідно більш високий рівень експресії був виявлений у пухлинах, які інтенсивно проліферують (p=0,012). Частина олігодендрогліальних пухлин показала відсутність експресії віментину пухлинними клітинами, це явище ми не спостерігали в астроцитарних пухлинах. У цілому рівень експресії віментину був вище в астроцитарних пухлинах (p=0). Між рівнями експресії GFAP і віментину було виявлено прямий статистично достовірний зв'язок (p=0,031).

Однією з проблем патоморфології нервової системи є диференційна діагностика астроцитарних і олігодендрогліальних пухлин, яка ускладнена настільки, що донедавна допускався термін «олігоастроцитома» для позначення тяжких випадків сполучення рис, характерних для обох типів пухлин [5]. Практичне значення зазначеної проблеми полягає в значній хіміочутливості саме олігодендрогліальних пухлин. У більшості керівництв, присвячених патоморфологічним, зокрема імуногістохімічним властивостям гліальних пухлин головного мозку, вказується на незначний рівень експресії GFAP в олігодендрогліальних пухлинах на відміну від позитивних астроцитом [4, 11, 12]. Наше дослідження довело деяку відносність таких уявлень, а також представило можливу методологію використання цієї закономірності.

Протеїни проміжних філаментів відіграють значну роль у переміщенні клітин [7], тому можна було б очікувати Grade-залежність експресії. Нами було показано, що тільки віментин більшою мірою експресувався в гліобластомах, ніж у менш злоякісних гліальних пухлинах.

ВИСНОВКИ

1. Виражена (++) експресія GFAP властива 92,5% астроцитарних пухлин та 58,3% олігодендрогліом (Grade II та III), p=0,011. Виражена експресія GFAP має місце у 78,6% дифузних гліом Grade II та III, а також 91,7% гліобластом (p>0,05).
2. Не експресують віментин 58,3% олігодендрогліальних пухлин, у 8,4% пухлин олігодендрогліального ряду визначається високий рівень експресії віментину. Астроцитарні пухлини характеризуються високим (57,5%) та помірним (42,5%) рівнем експресії віментину (p=0).
3. Виражена експресія віментину пухлинними клітинами властива для 85,7% гліобластом (Grade IV), 14,3% анапластичних дифузних гліом, 7,1% пухлин, віднесених до Grade II. Відмінність інтенсивності експресії віментину в гліобластомах та анапластичних гліальних пухлинах статистично значуща (p<0,05).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антомонов М.Ю. Математическая обработка и анализ медико-биологических данных / М.Ю. Антомонов. – Киев, 2006. – 558 с.
2. Пославська О.В. Методологія використання програмного забезпечення для аналізу цифрових мікрофотографій на базі курсу патоморфології з метою підвищення професійного рівня студентів і науковців / О.В. Пославська // Morphologia. – 2015. – Т. 9, № 3. – С. 122-126.
3. Шпонька І.С. Характеристика та аналіз KI-67-імунореактивності в астроцитомах головного мозку / І.С. Шпонька, Т.В. Шинкаренко, О.В. Пославська // Morphologia. – 2016. - Т. 10, № 1. – С. 96-101
4. Dabbs D. J. Diagnostic immunohistochemistry / D. J. Dabbs. – Elsevier Health Sciences, 2013. – 960 p.
5. Does morphological assessment have a role in classifying oligoastrocytoma as' oligodendroglial'versus' astrocytic'? / H.X. Bai, Y. Zou, A.M. Lee et al. // Histopathology. – 2016.– Vol. 68, N 7.– P. 1114-1115. doi: 10.1111/his.12891.
6. Intermediate filaments regulate astrocyte motility / E.A. Lepekhin, C. Eliasson, C. H. Berthold [et al.] // J. Neurochemistry. – 2001. – Vol. 79, N 3. – P. 617-625. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00595.x.
7. Kidd M.E. The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer / M.E. Kidd, D.K. Shumaker, K.M. Ridge // Am. j. Resp. Cell Molecular Biology. – 2014. – Vol. 50, N 1. – P. 1-6. doi: 10.1165/rcmb.2013-0314TR.
8. Lépinoux-Chambaud C. Review on intermediate filaments of the nervous system and their pathological alterations / C. Lépinoux-Chambaud, J. Eyer // Histochemistry Cell Biology. – 2013. – Vol. 140, N 1. – P. 13-22. doi: 10.1007/s00418-013-1101-1.
9. Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia / L. Li, A. Lundkvist, D. Andersson [et al.] // J. Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 2008. – Vol. 28, N 3. – P. 468-481. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600546.
10. Systematic immunohistochemical profiling of 378 brain tumors with 37 antibodies using tissue microarray technology / H. Ikota, S. Kinjo, H. Yokoo [et al.] // Acta Neuropathologica. – 2006. – Vol. 111, N 5. – P. 475. doi: 10.1007/s00401-006-0060-1.

11. Yachnis A. T. Neuropathology: A Volume in the High Yield Pathology Series / A. T. Yachnis, M. L. Rivera-Zengotita. – Elsevier Health Sciences, 2012 – 351 p.

12. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System / W. K. Cavenee, S.Y. Leung, C. Hawkins [et al.] // IARC, Lyon , 4 ed revised, 2016. – 408 p.

REFERENCES

1. Antomonov M. [Mathematical processing and analysis of medical and biological data.] Kyiv, FMD. 2006;558. Russian.

2. Poslavska OV. [Methodology for the use of software for the analysis of digital micrographs on the base of pathomorphology course in order to increase the professional level of students and scientists]. Morphologia. 2015;9(3):122-6. Ukrainian.

3. Shpon‘ka IS, Shynkarenko TV, Poslavska OV. [Characteristics and analysis of Ki-67-immunoreactivity in brain astrocytoma]. Morphologia. 2016;10(1):96-101. Ukrainian.

4. Dabbs DJ. Diagnostic immunohistochemistry. Elsevier Health Sciences; 2013.

5. Bai HX, Zou Y, Lee AM, Tang X, Zhang P, Yang L. Does morphological assessment have a role in classifying oligoastrocytoma as' oligodendroglial'versus' astrocytic'?. Histopathology. 2016;68(7):1114-5. doi: 10.1111/his.12891.

6. Lepekhin EA, Eliasson C, Berthold CH, Berezin V, Bock E, Pekny M. Intermediate filaments regulate astrocyte motility. Journal of neurochemistry. 2001;79(3):617-25. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00595.x.

7. Kidd ME, Shumaker DK, Ridge KM. The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. American journal of respiratory cell and molecular biology. 2014;50(1):1-6. doi: 10.1165/rcmb.2013-0314TR.

8. Lépinoux-Chambaud C, Eyer J. Review on intermediate filaments of the nervous system and their pathological alterations. Histochemistry and cell biology. 2013;140(1):13-22. doi:10.1007/s00418-013-1101-1.

9. Li L, Lundkvist A, Andersson D, Wilhelmsson U, Nagai N, Pardo AC, Nodin C, Ståhlberg A, Aprico K, Larsson K, Yabe T. Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2008;28(3):468-81. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600546.

10. Ikota H, Kinjo S, Yokoo H, Nakazato Y. Systematic immunohistochemical profiling of 378 brain tumors with 37 antibodies using tissue microarray technology. Acta neuropathologica. 2006;111(5):475-482. doi: 10.1007/s00401-006-0060-1.

11. Yachnis AT, Rivera-Zengotita ML. Neuropathology, A Volume in the High Yield Pathology Series (Expert Consult-Online and Print), 1: Neuropathology. Elsevier Health Sciences; 2013.

12. Cavenee WK, Leung SY, Hawkins C, Van Meir EG, Burger PC, & Tabori U WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, Revised. ISBN 978-92-832-4492-9.

Стаття надійшла до редакції
05.07.2017