

М.Р. ВЕРГОЛЯС, Т.В. ЛУЦЕНКО, В.В. ГОНЧАРУК

Інститут колоїдної хімії та хімії води ім. А.В. Думанського

НАН України, Київ

E-mail: vergolyas@meta.ua

**ЦИТОТОКСИЧНИЙ ВПЛИВ
ХЛОРФЕНОЛІВ НА КЛІТИНИ
КОРЕНЕВОЇ МЕРИСТЕМИ НАСІННЯ
ЦИБУЛІ БАТУНА
(*ALLIUM FISTULOSUM* L.)**



*Хлорфеноли є попередниками більш небезпечних екотоксикантів діоксанів та характеризуються мутагенними, канцерогенними властивостями. Методи біотестування на рослинних тест-об'єктах з вивчення впливу різних поллютантів дозволяють з'ясувати мутагенність та цитотоксичність досліджуваних речовин. Вивчено генотоксичний та цитотоксичний вплив розчинів пентахлорфенолу та трихлорфенолу на клітини кореневої меристеми проростків цибулі батуну *Allium fistulosum* (L.). Виявлено дозозалежне пригнічення проростання насіння цибулі батуну внаслідок впливу розчинів пентахлорфенолу та трихлорфенолу різних концентрацій, при цьому пентахлорфенол проявляє помітно більшу дозозалежну токсичну дію на проростання насіння, ніж трихлорфенол.*

© М.Р. ВЕРГОЛЯС, Т.В. ЛУЦЕНКО, В.В. ГОНЧАРУК, 2013

Вступ. Хлоровані феноли, або хлорфеноли, є токсичними для природного середовища органічними поллютантами, що потрапляють у водні екосистеми та ґрунти переважно зі стічними водами і відходами целюлозно-паперової та хімічної промисловості, а також з господарсько-побутовими відходами [1]. Відомо, що хлорфеноли утворюються за знезараження питної води хлором та при використанні антисептичних засобів у медицині [2].

Загальна формула хлорфенолів $\text{HO-C}_6\text{H}_{5-n}\text{Cl}_n$ ($n = 1-5$). За своїм агрегатним станом це кристали з різким неприємним запахом, добре розчиняються в органічних розчинниках, водних розчинах NaOH та обмежено у воді. Зі збільшенням кількості атомів хлору в ароматичному кільці, як відомо, збільшується токсичність хлорфенолів, їхня стійкість до розкладання та здатність до біоаккумуляції [3]. Хлорфеноли є попередниками більш небезпечних екотоксикантів – діоксинів.

Пентахлорфенол та 2,4,6-трихлорфенол характеризуються мутагенними та канцерогенними властивостями, а пентахлорфенол є найстійкішим та найтоксичнішим з усього ряду хлорфенолів. Згідно з програмою ООН по захисту оточуючого середовища (UNEP) у 2003 р. пентахлорфенол включено до переліку стійких органічних забруднювачів [4]. Саме тому зараз необхідні швидкі та ефективні методи оцінки якості води та її очищення [5].

В останні роки використання методів біотестування для визначення токсичних властивостей таких середовищ, як повітря, вода та ґрунт, набуває все більшого значення. Це обумовлюється рядом обставин: по-перше, вказані об'єкти зазвичай містять велику кількість інгредієнтів, токсикологічні властивості яких не завжди характеризуються простою сумою властивостей кожного з них із урахуванням кількісного складу, що визначається аналітичними методами; по-друге, середовище часто забруднене нестійкими сполуками, продукти розпаду яких іноді є більш токсичними, ніж початкові речовини; по-третє, кількість присутніх у навколишньому середовищі забруднювачів значно перевищує кількість фізико-хімічних методів аналізу, що дозволяють контролювати їхній вміст на рівні ГДК [6, 7].

Істотною перевагою біотестування є можливість отримати інтегральну токсикологічну

оцінку, а із застосуванням цитогенетичних методів – й мутагенну оцінку природних середовищ незалежно від складу забруднюючих речовин, оскільки велика частина поллютантів внаслідок відсутності спеціального устаткування, відповідних методик і стандартів аналітично не визначається, через що використання методів біотестування набуває все більшої популярності [8, 9].

Нині для тестування мутагенності навколишнього середовища застосовують мікроядерний тест [10], який заснований на виявленні мікроядер в еритроцитах ссавців, клітинах ембріонів, кореневій меристемі цибулі [11]. *Allium fistulosum* (L.) зазначений в літературі як об'єкт, що характеризується високою чутливістю до дії мутагенів та достовірністю одержуваних результатів, до того ж даний об'єкт за чутливістю наближається до культури клітин людини [12, 13].

Мікроядерний тест широко використовується для оцінки речовин, що мають генотоксичні властивості [14]. Цей тест, як відомо, не поступається за своєю інформативністю тесту на хромосомні аберації та анафазному методу переліку хромосомних перебудов [15].

На клітинному рівні показником мутаційного процесу є хромосомні аберації, підвищений рівень яких розглядається як хромосомна нестабільність [16, 17]. Остання разом з гіпермутабільністю спричинює розвиток злоякісних новоутворень [18].

Матеріали та методи. Для дослідження генотоксичного та цитотоксичного впливу водних розчинів хлорфенолів на клітини кореневої меристеми проростків цибулі батуну (*Allium fistulosum* L.) використовували цитогенетичні методи та методи біотестування, зокрема біотест на мікроядра у клітинах та на двоядерні клітини. Аналізували чутливість клітин кореневої меристеми проростків *Allium fistulosum* L. до впливу хлорфенолів.

Як тест-об'єкт при проведенні досліджень використовували насіння цибулі батуну *Allium fistulosum* (L.) сорту Майський. Насіння придбане у агрофірми «Астарта», врожай 2010 р. Насіння пророщували протягом 72 год в термостаті при температурі 24 °С. Для мікроскопічного аналізу готували тимчасові давлені препарати, фарбовані ацетоорсеїном [19].

Для негативного контролю використовували насіння, яке культивували на середовищі Кнопа, що є загальнозживаним і складається з наступних компонентів: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1 %) – 8 мг/л, KH_2PO_4 (5 %) – 4 мг/л, KNO_3 (10 %) – 2 мг/л, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 %) – 2 мг/л, KCl (10 %) – 1 мг/л, Fe лимоннокислий – 5 мг/л.

Для отримання позитивного контролю на мутагенність використовували розчин формальдегіду, концентрацію якого визначали шляхом пророщування насіння у розчинах різних концентрацій ($2 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-3}$ %) формальдегіду. Оптимальною виявилася концентрація $4 \cdot 10^{-5}$ %, що була обрана у подальшій роботі як позитивний контроль.

Досліджували генотоксичний вплив розчинів пентахлорфенолу та трихлорфенолу за показниками рівня двоядерних клітин кореневої меристеми насіння цибулі *Allium fistulosum* (L.) та мікроядер у клітинах.

Концентрації розчинів пентахлорфенолу та трихлорфенолу для даних досліджень встановили емпірично.

При проведенні досліджень використовували одну з модифікацій *Allium*-тесту. Повторюваність експериментів двократна. Висівали по 50 насінин цибулі батуну в кожний дослідний розчин на фільтрувальний папір у чашках Петрі. Для фіксації і подальшого приготування цитологічних препаратів відбирали насіння з корінням довжиною 4–9 мм.

Критерій довжини корінців обумовлений необхідністю фіксації саме перших мітозів з метою виключення дії систем репарації у подальших поділах клітин кореневої меристеми та елімінації більшості фрагментів і окремих абераційних клітин. Фіксацію корінців разом з насінням здійснювали впродовж доби у розчині Кларка, що являє собою охолоджені $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} : \text{CH}_3\text{COOH}$ у співвідношенні 3:1.

Хімічну мацерацію коренів проводили протягом 120 хв у 45%-ному розчині CH_3COOH . Після мацерації корінці батуну з метою аналізу хромосомних аберацій, двоядерних клітин, мікроядер та проліферативної активності клітин переносили у сухі порцелянові чашки і додавали по краплях розчин ацетоорсеїну. Корінці фарбували при температурі 24 °С

впродовж 1–1,5 год. Коли корені набували темно-червоного забарвлення, їх відмивали мацеруючим розчином та готували тимчасові давлені цитологічні препарати.

Аналіз препаратів проводили у наступному порядку: спочатку визначали мітотичний індекс, потім окремо по корінцях – кількість клітин з мікроядрами та двоядерними клітинами на кожні 500 клітин.

Кількість мікроядер та подвійних ядер визначали окремо по корінцях на кожні 500 клітин. З кожного препарату проаналізовано 3000 клітин.

Для аналізу мітотичного індексу в полі зору мікроскопа серед загальної кількості (3000 клітин) підраховували кількість клітин на різних стадіях мітозу.

На заключному етапі досліджень проводили математичну обробку даних згідно із загальновизнаними методиками [20], попарну кореляцію та регресійний аналіз здійснювали з використанням пакету програм «STATISTIKA».

Результати досліджень та їх обговорення. Зразок цитологічного препарату клітин ко-

реневої меристеми проростків *A. fistulosum* L. представлений на рис. 1.

Мітотичну активність клітин після експозиції на розчинах пентахлорфенолу та трихлорфенолу різних концентрацій наведено у таблиці.

Так, найменший вплив пентахлорфенолу та трихлорфенолу серед досліджених концентрацій показали зразки, вирощені на розчинах з концентрацією 0,316 мкМ. Порівняно з контролем гальмування проростання насіння становило 16,14 % для пентахлорфенолу та 5,38 % для трихлорфенолу. Максимальний токсичний ефект викликали розчини з концентрацією пентахлорфенолу та трихлорфенолу 31,6 мкМ, у цьому випадку гальмування проростання порівняно з контролем становило 86,4 % для пентахлорфенолу та 69,12 % для трихлорфенолу.

У найнижчій концентрації (0,316 мкМ) пентахлорфенол пригнічує проростання насіння на 10,76 % більше, ніж трихлорфенол, а у найвищій (31,6 мкМ) – на 17,28 %, що свідчить про його більшу токсичну дію на насіння цибулі батуну.

Дані щодо проліферативної активності клітин підтвердили результати аналізу загальної токсичності пентахлорфенолу та трихлорфенолу на рівні організму. Досліди показали, що мітотична активність апікальної меристеми корінців насіння цибулі батуну, культивованого на розчинах хлорфенолів різних концентрацій, в більшості випадків достовірно нижча, ніж у контролі.

Спостерігали закономірне зменшення кількості мітотичних клітин у кореневій меристемі насіння, культивованого на розчинах пентахлорфенолу та трихлорфенолу різних концентрацій, в порівнянні з контролем.

Отримані результати свідчать про цитотоксичну дію пентахлорфенолу та трихлорфенолу на клітини кореневої меристеми насіння. Згадані сполуки у дослідженому діапазоні концентрацій викликають дозозалежне пригнічення проліферативної активності клітин кореневої меристеми насіння. Пентахлорфенол проявляє сильнішу цитотоксичну дію, ніж трихлорфенол, що відповідає даним про загальну токсичність на рівні організму. Найнижчу цитотоксичність проявляв розчин три-

Мітотична активність клітин кореневої меристеми насіння цибулі батуну, %

Досліджувані зразки	Мітотичний індекс	Інгібуюча мітотична активність контролю
Контроль		
середовище Кнопа	11,76 ± 0,59	–
формальдегід (4 · 10 ⁻⁵ %), мкМ	10,4 ± 0,67	11,61 ± 1,72
Пентахлорфенол, мкМ		
0,316	9,86 ± 0,46	16,14 ± 2,46
1	7,96 ± 0,44	32,29 ± 2,44
3,16	6,23 ± 0,38	47,02 ± 4,38
10	4,1 ± 0,32	64,87 ± 4,32
31,6	1,6 ± 0,12	86,4 ± 4,12
Трихлорфенол, мкМ		
0,316	11,1 ± 0,52	5,38 ± 1,52
1	10,1 ± 0,59	14,44 ± 2,59
3,16	9,03 ± 0,39	23,22 ± 2,39
10	6,93 ± 0,5	41,07 ± 4,5
31,6	3,63 ± 0,28	69,12 ± 5,28

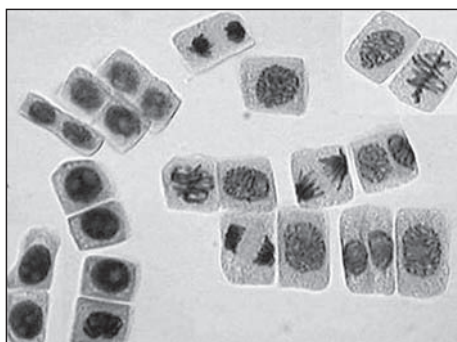


Рис. 1. Клітини меристеми корінців цибулі на різних стадіях мітозу (об. 100, ок. 12). Забарвлення ацетоорсеїном

хлорфенолу із концентрацією 0,316 мкМ. В порівнянні з контролем пригнічення мітотичної активності складало 5,38 %. Найвищу цитотоксичність проявляв пентахлорфенол у концентрації 31,6 мкМ, в цьому випадку інгібування мітотичної активності відповідно до контролю становило 86,4 %. Концентрація пентахлорфенолу 3,16 мкМ зменшувала мітотичну активність на 47,02 %, що майже дорівнює половинному пригніченню.

В усіх досліджених концентраціях пентахлорфенол здійснював більший інгібуючий вплив на мітотичну активність клітин кореневої меристеми цибулі батунна, ніж трихлорфенол, що свідчить про його більшу цитотоксичність. У літературі зазначені цитогенотоксичні властивості пентахлорфенолу, особливо для рослинних тест-організмів [21].

Збільшення числа клітин із мікроядрами та патологіями поділу супроводжується, як правило, пригніченням мітотичної активності. Це може бути зумовлено пониженою життєздатністю клітин з мікроядрами [22].

Під час мікроскопічного аналізу цитологічних препаратів кореневої меристеми проростків *A. fistulosum* L. після експозиції на розчинах хлорфенолів спостерігали появу двоядерних клітин та мікроядер у клітинах (рис. 2). Результати проведених досліджень представлені на рис. 3 та 4.

Серед досліджених концентрацій розчинів хлорфенолів найзначніше збільшення частоти двоядерних клітин та мікроядер у клітинах спричинювала концентрація пентахлорфено-

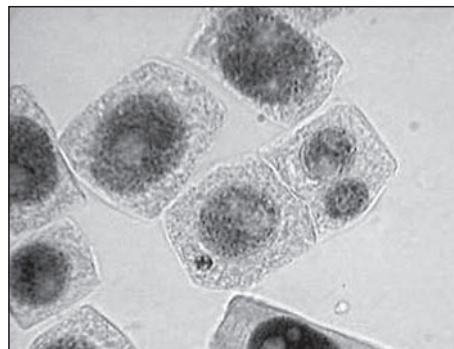


Рис. 2. Двоядерні клітини та мікроядра в клітинах меристеми коренів цибулі (об. 100, ок. 12). Забарвлення ацетоорсеїном

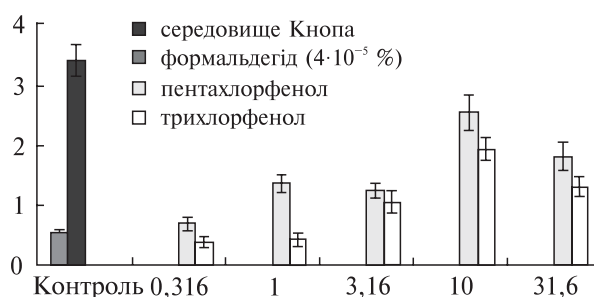


Рис. 3. Середня незважена частота мікроядер на меристему (по вертикалі) після експозиції на розчинах хлорфенолів різних концентрацій (по горизонталі, мкМ)

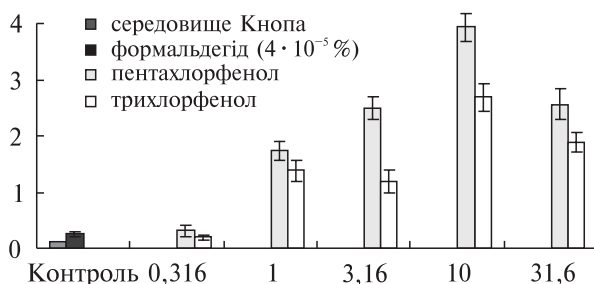


Рис. 4. Середня незважена частота двоядерних клітин на меристему (по вертикалі) після експозиції на розчинах хлорфенолів різних концентрацій (по горизонталі, мкМ)

лу 10 мкМ. Найменшу генотоксичну та цитотоксичну дію мала концентрація трихлорфенолу 0,316 мкМ, у цьому випадку частота двоядерних клітин відповідно до контролю залишалася приблизно на такому ж рівні, а частота мікроядер трохи зменшувалася. За

найменших концентрацій досліджуваних речовин (0,316 мкМ) частота мікроядер у клітинах та двоядерних клітин залишалася приблизно на рівні контролю. При цьому за найбільшої концентрації як для пентахлорфенолу, так і для трихлорфенолу (31,6 мкМ) частота мікроядер у клітинах та двоядерних клітин помітно зменшувалася порівняно з максимальним показником у концентрації 10 мкМ. Це пояснюється сильним інгібуванням проліферативної активності клітин кореневої меристеми розчинами хлорфенолів у максимальних концентраціях.

Як і у випадку з пентахлорфенолом, найбільше підвищення рівня мікроядер у клітинах та двоядерних клітин для трихлорфенолу спостерігалось при концентрації 10 мкМ, але в порівнянні з пентахлорфенолом цей показник був помітно менший, що свідчить про більшу генотоксичну та цитотоксичну дію останнього.

За отриманими даними дія пентахлорфенолу в усіх концентраціях, окрім 0,316 мкМ, викликала більш значне підвищення частоти двоядерних клітин, ніж мікроядер у клітинах. Лише за концентрації 0,316 мкМ спостерігалось більше підвищення частоти мікроядер. Дія трихлорфенолу була подібною. За концентрації 0,316 мкМ збільшення частоти мікроядер у клітинах було дещо вищим за ріст кількості двоядерних клітин. В усіх наступних концентраціях, так само як і за дії пентахлорфенолу, частота двоядерних клітин була вищою.

Дані, отримані за показниками збільшення частоти двоядерних клітин, підтверджують цитотоксичну дію хлорфенолів, яка спостерігалася за інгібування мітотичної активності клітин кореневої меристеми проростків цибулі батуну. Простежується також генотоксична дія розчинів хлорфенолів різних концентрацій за показниками рівня мікроядер. При цьому пентахлорфенол в усіх концентраціях викликав появу більшої кількості мікроядер у клітинах та двоядерних клітин, ніж трихлорфенол, що свідчить про його вищу цитотоксичну та генотоксичну активність.

За даними літературних джерел при дослідженні пентахлорфенолу, ліндану, ДДТ, мі-

ді, метолахлору й миш'яку спостерігався значний генотоксичний ефект на клітини меристеми *Allium cepa* та *Lactuca sativa* [23].

У роботі Довгалюк [1] *Allium*-тест (тест з *Allium cepa*) був використаний для оцінки впливу сполук важких металів на клітини кореневої меристеми цибулі. На основі згаданих досліджень запропоновано два ряди токсичності солей металів: за ефективними концентраціями та за сублетальними і летальними ефектами, в обох випадках найтоксичнішим виявився сульфат міді.

Висновки. Пентахлорфенол та трихлорфенол за високих концентрацій (10 та 31,6 мкМ) проявляють гостру токсичну дію на рівні організму, пригнічуючи здатність насіння до проростання. Спостерігалось закономірне зменшення кількості мітотичних клітин у кореневій меристемі насіння, культивованого на розчинах пентахлорфенолу та трихлорфенолу різних концентрацій, в порівнянні з контролем. Для досліджених сполук характерна цитотоксична активність, яка проявляється у збільшенні кількості двоядерних клітин та інгібуванні проліферативної активності клітин. При цьому пентахлорфенол проявляє вищу цитотоксичну активність, ніж трихлорфенол. Чутливість клітин кореневої меристеми проростків батуну до впливу хлорфенолів залежить від умов їх дії, а саме від їхньої концентрації.

*M.R. Vergolyas,
T.V. Lutsenko, V.V. Goncharuk*

CYTOTOXIC INFLUENCE
OF CHLOROPHENOLS ON THE ROOT
MERISTEM CELLS OF ONION BATUNA
SEEDS (*ALLIUM FISTULOSUM* L.)

Chlorophenols are precursors to more dangerous toxicants dioxanes and are characterized with mutagenic and carcinogenic properties. Mutagenicity and cytotoxicity of chemical substances can be studied using methods of plant biological testing under the influence of different pollutants. Genotoxic and cytotoxic effects of pentachlorophenol and 3-chlorophenol solutions in root meristem cells of *Allium fistulosum* (L.) were investigated. Dose-dependent inhibition of onion seed germination under the influence of 5-chlorophenol and 3-chlorophenol solutions in different concentrations was revealed. Pentachlorophenol showed significantly greater dose-dependent toxic effect on seed germination than 3-chlorophenol.

М.Р. Верголяс, Т.В. Луценко, В.В. Гончарук

ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ
ХЛОРФЕНОЛОВ НА КЛЕТКИ КОРНЕВОЙ
МЕРИСТЕМЫ СЕМЯН ЛУКА БАТУНА
(*ALLIUM FISTULOSUM* L.)

Хлорфенолы являются предшественниками более опасных экотоксикантов диоксанов и характеризуются мутагенными, канцерогенными свойствами. Методы биотестирования на растительных тест-объектах по изучению влияния различных поллютантов позволяют выяснить мутагенность и цитотоксичность исследуемых веществ. Изучено генотоксическое и цитотоксическое влияние растворов пентахлорфенола и трихлорфенола на клетки корневой меристемы проростков лука батун *Allium fistulosum* (L.). Выявлено дозозависимое угнетение прорастания семян лука батун в результате воздействия растворов пентахлорфенола и трихлорфенола разных концентраций, при этом пентахлорфенол проявил заметно большее дозозависимое токсическое действие на прорастание семян, чем трихлорфенол.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРИ

1. Nilan R.A. Potential of plant genetic systems for monitoring and screening mutagens // Environ. Health Persp. – 1978. – 27. – P. 181–196.
2. Pinkel D., Straume T., Gray J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1986. – 83. – P. 2934–2938.
3. Меннинг У.Д., Федер У.А. Биомониторинг загрязнения атмосферы с помощью растений. – Л.: Гидропромиздат, 1985. – 175 с.
4. Environmental Mutagenesis (Human Molecular Genetics) / Eds D.H. Phillips, S. Venitt. – Oxford: Bios Sci. Publ., 1995. – 403 p.
5. Arkhipchuk V.V., Goncharuk V.V., Chernykh V.P. et al. Use of plant and animal bioassays and biomarkers for complex estimation a general toxicity, genotoxicity and cytotoxicity of drugs // Современные проблемы токсикологии. – Киев, 2005. – С. 17–25.
6. Зерщикова Т.А., Флоринская Л.П. Современная проблематика анализа качества питьевой воды путем биотестирования // Фундамент. исследования. – 2006. – № 11. – С. 54–55.
7. Воронова Г.Л., Адамчик Г.Г., Куцко Л.А. Экспериментальное биотестирование качества воды реки Днепр // Вопр. рыб. хозяйства Беларуси: Сб. науч. тр. – Минск, 2003. – Вып. 19. – 298 с.
8. Дятлов С.Е. Роль и место биотестирования в комплексном мониторинге загрязнения морской среды // Экология моря. – 2000. – Вып. 51. – С. 83–87.
9. Архипчук В.В., Гончарук В.В. Биотестирование качества воды на клеточном уровне // Химия и технология воды. – 2001. – 23, № 5. – С. 531–544.
10. Ильинских Н.Н., Новицкий В.В., Варгунова Н.И., Ильинских И.Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 1991. – 272 с.
11. Klumpp A., Ansel W., Klumpp G. et al. Tradescantia micronucleus test indicates genotoxic potential of traffic emissions in European cities // Environm. Poll. – 2006. – 139, № 3. – P. 515–522.
12. Fiskesjo G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring // Hereditas. – 1985. – 102. – P. 92–112.
13. Золотарева Г.Н., Исхакова Э.Н., Облапенко Н.Г. Использование семян *Allium fistulosum* L. в качестве предварительного теста при изучении мутагенных факторов окружающей среды // Цитология и генетика. – 1977. – 11, № 1. – С. 62–65.
14. Архипчук В.В., Малиновская М.В. Применение комплексного подхода в биотестировании природных вод // Химия и технология воды. – 2000. – 22, № 4. – С. 428–443.
15. Довгалюк А.И., Калиняк Т.Б., Блюм Я.Б. Оценка фито- и цитотоксической активности соединений тяжелых металлов и алюминия с помощью корневой апикальной меристемы лука // Цитология и генетика. – 2001. – 35, № 1. – С. 3–9.
16. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека: история хромосомы человека, формальная генетика. – М.: Мир, 1989. – Т. 1. – 312 с.
17. Гилева Э.Т. Хромосомная изменчивость и эволюция. – М.: Наука, 1990. – 142 с.
18. Jackson A.L., Loeb L.A. The mutation rate and cancer // Genetics. – 1998. – 148. – P. 1483–1490.
19. Дарлингтон С.Д., Ла Кур Л.Ф. Хромосомы: Методы работы. – М.: Атомиздат, 1980. – 250 с.
20. Лакин Г. Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 351 с.
21. Pavlica M., Vasilevska J., Papes D. Genotoxicity of pentachlorophenol revealed by *Allium* chromosome aberration assay // Acta Biol. Cracovien. – 1998. – 40. – P. 85–90.
22. Takatsuji T., Takayanagi H., Morishita K. et al. Induction of micronuclei in germinating onion seed root tip cells irradiated with high energy heavy ions // J. Rad. Res. – 2010. – 51, № 3. – P. 315–323.
23. Arkhipchuk V.V., Malinovskaya M.V., Garanko N.N. Cytogenetic study of organic and inorganic toxic substances on *Allium cepa*, *Lactuca sativa* and *Hydra attenuata* cells // Environ. Toxicol. and Water Quality. – 2000. – 15, № 4. – P. 338–344.

Надійшла 07.07.11