

УДК 574.64: 57.083.37

АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ПИТЬЕВЫХ ВОД ПРИ ПОМОЩИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ**Верголяс М.Р.**

*Институт коллоидной химии и химии воды им. А.В. Думанского НАН Украины,
Украина, 03680, г. Киев, бул. Акад. Вернадского, 42, e-mail:
vergolyas@meta.ua*

Проведено биотестирование и цитогенетический анализ для оценки качества питьевых вод из разных источников на организменном и клеточном уровнях тест-объектов представителей разных систематических групп и трофических уровней: водный объект — гидра, дафния, рыба и лягушка, растительный объект — лук посевной, пшеница и семена огурцов. Критериями оценки были общая токсичность на организменном уровне, на клеточном уровне — анализ митотического индекса, микроядерный тест и лейкоцитарная формула крови, в частности количественная характеристика лимфоцитов. Методы исследования токсичности водных образцов позволили выявить влияние их на гидробионты и на растительные тест-объекты, также изменения клеточных структур растений и гематологических показателей рыб, лягушек, которых можно предложить для оценки качества питьевых вод. Показана актуальность и перспективность использования тест-объектов при оценке токсичности питьевых вод, а именно гематологических показателей тест-организмов. В периферической крови животных и человека при нормальных физиологических условиях организма состав и соотношение форменных элементов находятся в состоянии равновесия. Нарушение взаимоотношений между этими процессами, обусловленное реакцией организма на раздражение токсического характера, проявляется в изменении качественного и количественного состава клеток периферической крови.

Ключевые слова: *питьевая вода, тест-организм, биотестирование, периферическая кровь, цитотоксичность, генотоксичность.*

При оценке качества воды в мировой практике, помимо обычного химического анализа наиболее распространенных загрязнителей проводят суммарную токсикологическую оценку воды, основанную на применении различных методов биотестирования.

Методические основы биотестирования качества вод направлены на оценку токсических веществ поступающих в водную среду. Метод биотестирования позволяет выявить летальные и сублетальные концентрации потенциальных загрязняющих

веществ в воде, а также на клеточном и субклеточном уровнях для живых организмов в лабораторных условиях. Биомониторинг природных и питьевых вод — это актуальная задача на современном этапе развития общества, которая проводится научными коллективами во многих странах мира. Химические анализы при определении качества питьевой воды не всегда могут выявить всего набора элементов, присутствующих в водном растворе, оценить их взаимодействие и трансформацию в среде и организме. Эти методы

дают оценку превышения отдельных компонентов к их лимитирующим показателям ПДК (предельно-допустимая концентрация) для водных объектов, в основном подвергающихся воздействию стоков [1].

Биотестирование - это биологический контроль, который предполагает целенаправленное использование стандартных тест-организмов и методов для определения степени токсичности водной среды, основанный на измерении тест-реакции организма, его отдельной функции или системы [2].

Для объективного и комплексного контроля за все увеличивающимся числом ксенобиотиков, загрязняющих водную среду, большинство из которых не нормируются существующими стандартами, однако обладают способностью вызывать разнообразные токсические, цитотоксические, генотоксические или мутагенные эффекты крайне важно использование тест-организмов и их клеточных биомаркеров [3].

Цель работы — определение и обоснование наиболее оптимальных подходов по технической простоте и универсальности к изучению качества питьевых вод на организменном и клеточном уровнях.

Для получения комплексной оценки токсического воздействия корректно изучать как на организменном, так и клеточном уровнях. В частности, на уровне организма можно анализировать реакции представителей разных систематических групп и трофических уровней, на уровне клетки — структурные изменения ядер и функциональные состояние системы крови организма (гено- и цитотоксичность).

Для анализа влияния токсических веществ в водных образцах на организм и его клетки был отобран следующий набор биотестов: расте-

ния — лук (*Allium cepa*), пшеница (*Triticum*), огурец (*Cucumis sativus*); беспозвоночные — гидра (*Hydra attenuate*), дафния (*Ceriodaphnia affinis*); позвоночные животные — рыбы (*Danio rerio*), шпорцевые лягушки (*Xenopus*).

Набор клеточных критериев включает в себя долю клеток с микроядрами и аномальными ядрами (регистрируют структурные нарушения в наследственном аппарате клетки) и количественные характеристики лейкоцитов в периферической крови (отражают функциональные изменения организма) [4].

В клетках корешка растений определяли митотический индекс (изменения в доле делящихся клеток как показатель цитотоксичности) и количество клеток с двойными ядрами и ядерными нарушениями (показатели генотоксичности) [5, 6].

Гематологические показатели живых организмов являются индикатором не только физиологического состояния организма, но и одним из основных критериев выявления загрязнения питьевых вод [4,7].

Материалы и методы исследования

В работе использовали водные образцы питьевых вод — артезианской, водопроводной и фасованной воды. Для оценки влияния токсичности водных образцов на водные тест-организмы использовали по 40 экземпляров каждой особи (гидры (*Hydra attenuate*), дафнии (*Ceriodaphnia affinis*), рыбы (*Danio rerio*), шпорцевые лягушки (*Xenopus*)), культивированных в лабораторных условиях. Тест-организмы были разделены на 4 группы по 10 особей. Каждую группу помещали в определенную емкость: №1 — контрольная вода, №2 — артезианская вода, №3 — водопроводная вода и №4 — фасованная вода. Для оцен-

ки генотоксичности водных образцов, после экспозиции через 96 часов, у каждой рыбы из хвостовой вены брали кровь. От каждой лягушки брали кровь из задней лапки. Приготовление и анализ цитологических препаратов из периферической крови рыб и лягушек проводили по стандартной методике [4, 8]. Для проведения биотестирования с использованием растительных тест-объектов, также брали по 40 экземпляров каждого объекта (лук посевной, семена пшеницы и огурцов), разделяли их на 4 группы по 10 экземпляров. Семена проращивали в чашках Петри в исследуемых образцах воды, а посевной лук — в пробирках. Анализ и приготовление цитологических препаратов из проросших корешков проводили по стандартной методике [5, 6]. Контрольную воду приготавливали в лабораторных условиях согласно рекомендациям ДСТУ 4174: 2003, которая соответствовала по требованиям ГСанПиН 2.2.4-171-10 [9]. Статистическую обработку проводили стандартными методами; токсический эффект считается действительным

при статистически достоверной разнице с контролем [10].

Результаты и их обсуждение

В результате исследования проведено биотестирование и цитологический анализ исследуемых проб питьевых вод — артезианской, водопроводной и фасованной воды. Влияния вод на тест-организмы, отображено в таблице 1. Указаны данные общей токсичности (выживаемости) гидробионтов.

В образцах с исследуемой водопроводной и фасованной водами наблюдались гибель тест-организмов. Выживаемость гидр — в образцах вод №3 составляло 20 % и №4 — 50 %. Организмы дафнии в образце №3 выжили — 30 %, а в образцах №4 — 50 %, соответственно. Рыбы — в исследуемой воде №3 выжили — 70 %, №4 — 80 % в сравнении с контролем. Во всех образцах вод 100 % выжили только тест-организмы лягушки, но общее физиологическое состояние у них ухудшилось в исследуемых водопроводной и фасованной водах.

Цито-генотоксическая оценка различных типов

Таблица 1

Влияние исследуемых вод на тест-организмы, экспозиция 96 часов

Тест-организмы, выживаемость, n = 10	№1 Контрольная вода, %	№2 Артезианская вода, %	№3 Водопроводная вода, %	№4 Фасованная вода, %
Гидра	100	100	20*	50*
Дафния	100	100	30*	50*
Рыба	100	100	70	80
Лягушка	100	100	100	100

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

вод (артезианская, водопроводная, фасованная) на клетках корешков растительных тест-объектов показаны в таблице 2.

Таблица 2

Цитогенетическая оценка исследуемых вод на растительных тест-объектах

Тест-объекты, n = 10	Контрольная вода, %		Артезианская вода, %		Водопроводная вода, %		Фасованная вода, %	
	МИ	МЯ, 2N,‰	МИ	МЯ, 2N,‰	МИ	МЯ, 2N,‰	МИ	МЯ, 2N,‰
Показатели	МИ	МЯ, 2N,‰	МИ	МЯ, 2N,‰	МИ	МЯ, 2N,‰	МИ	МЯ, 2N,‰
Лук	128	0	126	0,33	90*	6,67*	102	3,99*
Пшеница сем.	118	0	118	0,33	86*	6,33*	94*	3,67*
Огурцов	120	0	124	0	92	6,33*	98*	3,99*

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, МИ — количества митотического индекса, МЯ — клетки с микроядрами; 2N — клетки с двойными ядрами.

В результате в образцах питьевых вод — водопроводной и фасованной, в клетках корешков растительных тест-объектах обнаружены микроядра и двойные ядра от 3,67 до 6,67

‰, а в артезианской воде — отмечено незначительное количество клеток с аномальным ядром 0,33‰ в сравнении с контролем. Наблюдались также угнетение по количеству митотических индексов в водопроводной и фасованной воде, от 86 до 98 по сравнению с контрольной водой.

Изменения клеточных структур растений, в частности лука (*Allium cepa*), предполагают генотоксические и мутагенные последствия для высших животных, в том числе и человека [5, 6, 11].

Генотоксическая оценка питьевых вод (артезианская, водопроводная и фасованная) проводилась на клетках периферической крови гидробионтов (рыб и лягушек). Эритроциты крови рыб и лягушек в момент воздействия токсических веществ, которые претерпевали морфологические изменения, были выявлены с помощью микроскопии при общем увеличении $\times 1000$. На каждом препарате просматривали 3000 клеток. Генотоксическое влияния образцов вод, на эритроцитах периферической крови рыб *Danio rerio* и шпорцевых лягушек *Xenopus*, отображено в таблице 3. Подсчет количества образцованных микроядер и двойных ядер

в эритроцитах выражены в промиллях — ‰.

Из полученных данных видно, что результаты артезианской воды были близки к контрольной воде, выявлено незначительное количество двойных ядер, всего лишь — 0,33‰. В образцах фасованной и водопроводной вод количества микроядер и двойных ядер достигли от 1,33 до 4 ‰ по сравнению с контролем.

Образование микроядер, фрагментация хромосом часто возникают в процессе развития онкозаболевания, при вирусной инфекции, бактериальном заражении, а также при воздействии на клетки ионизирующего облучения и различных мутагенов. Стойкая корреляционная связь количества поврежденных абберрантных метафаз с метаболической активацией выявлена между показателями определяемой культуры лимфоцитов периферической крови человека и на луке [6, 12].

По микроядерному тесту и по количественной характеристике лимфоцитов рыб и лягушек реагируют сходным образом с млекопитающими, в том числе и человеком. Поэтому рыб рекомендуют использовать для скрининга потенциально опасных для человека веществ, вызывающих урод-

Таблица 3

Цитогенетическая оценка исследуемых вод на клетках крови рыб и лягушек

Образцы исследованных вод		Контрольная вода	Артезианская вода	Водопроводная вода	Фасованная вода
Показатели аномалии ядер эритроцитов					
эритроциты рыб	мЯ ‰	0	0	3,63*	1,67*
	2N ‰	0	0,33	4*	3*
эритроциты лягушек	мЯ ‰	0	0	3,33*	1,33*
	2N ‰	0	0	3,66*	2,33*
Количественные показатели лимфоцитов					
лимфоциты рыб	%	86,7	84,9	68,4*	80,8
лимфоциты лягушек	%	78,4	78,8	60,2*	75,2

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, мЯ — клетки с микроядрами; 2N — клетки с двойными ядрами.

ства и раковые заболевания, а также генотоксических веществ, попадающих в питьевую воду. Это подтверждают коэффициенты корреляции между показателями на рыбах и в культуре лимфоцитов периферической крови человека. Полученные значения коэффициентов

линейной корреляции свидетельствуют о взаимосвязи почти всех показателей, определяемых на рыбах, и количества поврежденных аберрантных метафаз с метаболической активацией [12].

Воздействия токсикантов на организм сопровождаются с изменениями количественного состава нейтрофилов. В эксперименте отмечено уменьшение количества лимфоцитов в образцах воды водопроводной и фасованной — от 3,2 до 18,3 % в сравнении с контрольной водой. Такие данные могут указывать на развитие воспалительной реакции в организме подопытных животных в последствии действия токсических веществ в воде.

Лейкоциты играют очень важную роль в защите организма от токсических воздействий, бактериальных и грибковых инфекций. Рост количества нейтрофилов в крови - это ответ организма на воздействия токсикантов, бактериальных и многих других инфекций. Возникновение лимфопении (уменьшение количество лимфоцитов) характерно для начальной стадии инфекционно-токсического процесса и связано с их миграцией из сосудов в ткани к очагам воспаления [12, 13].

Универсальность клеточной организации рыб открывает широкие возможности для токсикологических исследований с последующей экстраполяцией полученных результатов на клетки и организм человека [14, 15]. В нашей работе для характеристики структурных и количественных изменений важнейших компонентов клеточного ядра (хромосом и генов), являющихся носителями генетической информации, использовали цитогенетический метод - микроядерный тест [4, 15]. До настоящего времени вопрос о том, играет ли формирование микроядер особую роль в канцерогенезе, остается откры-

тым. В любом случае микроядра указывают на геномную нестабильность [16].

При определении качества питьевых вод методами биотестирования возникает ряд важных вопросов относительно экстраполяции полученных результатов на организм человека, как, например, являются ли данные о токсичности водных проб, полученные с помощью животных и растительных тест-организмов, сигналом опасности и для человека. Перечисленные выше работы дают возможность правильности переноса результатов, полученных на уровне клетки, на более высокие уровни организации.

Наиболее приемлемыми для экстраполяции на организм человека являются методы, оценивающие мутагенность, гено- и цитотоксичность, т.е. (суб)клеточные эффекты. Этот вывод обосновывается результатами нескольких международных программ (Gene-Tox, International Program on Chemical Safety-IPCS), выполненных в 90-х годах. [16, 17].

Подобного исследования рода необходимы, так как в окружающей среде общее количество химических соединений увеличиваются каждым годом. Они имеют ряд преимуществ перед физико-химическим анализом, при помощи которого зачастую не удается обнаружить неустойчивые соединения или количественно определить ультранизкие концентрации экотоксикантов. Биотестирование же дает возможность быстрого получения интегральной оценки токсичности [17].

Перечисленные методы удовлетворяют современным требованиям, предъявляемым к исследованиям качества водных образцов. Они определяют их биологические свойства на (суб)клеточном уровне, регистрируют изменения в наследствен-

ном аппарате, объективно характеризуют отдаленные последствия их воздействия.

Выводы

В образцах питьевых вод водопроводной и фасованной наблюдалась гибель тест-организмов от 20 до 80 %. В результате микроядерного теста проведенного на клетках корешков растительных тест-объектах и на эритроцитах крови рыб и лягушек, исследуемые образцы вод (фасованная и водопроводная) проявили генотоксический эффект, количества микроядер и двойных ядер достоверно ($p < 0,05$) увеличились от 3,37 до 6,67 %, соответственно, по сравнению с контрольной водой, а данные артезианской воды соответствовали с данными контрольной.

При цитологическом анализе исследуемых образцов вод лимфоциты периферической крови тест-организмов рыб и лягушек реагировали почти одинаково. Отмечено уменьшение численности лимфоцитов в образцах водопроводной и фасованной воды. Также в этих водах наблюдались достоверное ($p < 0,05$) угнетение митотического индекса в растительных тест-объектах.

Реакция тест-организмов на раздражение токсических веществ в питьевых водах привели к гибели гидробионтов (на организменном уровне). На клеточном уровне отмечено: образование микроядер и двойных ядер в эритроцитах, корешках растений; угнетение митотического индекса; изменение количественного состава лимфоцитов периферической крови. В результате проведенного эксперимента можно дать положительную оценку только артезианской воде. Остальные образцы вод, особенно водопроводная, не пригодны для употребления. Рекомендуется пересмотреть их технологию водоподготовки.

Литература

1. М. Р. Верголяс М. В.В. Гончарук. Оценка контроля качества воды с помощью тест-организмов и их клеток // Химия и технология воды т.38, №1 2016
2. Верголяс М.Р., Трахтенберг И.М., Дмитруха Н.Н., Гончарук В.В. Оценка токсического влияния воды из разных источников на тест-организмы // Фактори експериментальної еволюції організмів, Збірник наукових праць. м. Київ, 2016г., — Т.19, С. 97-102.
3. M. Vergolyas. Cytogenetic evaluation of the drinking water toxicity // «EUREKA: Life Sciences», 2016. — №1. — 47-54p.
4. ДСТУ 7387: 2013 ДСТУ 7387: 2013. Якість води. Метод визначення цитота генотоксичності води і водних розчинів на клітинах крові прісноводної риби Даніо репіо (Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan). — Введ. 2013
5. Верголяс М. Р., Луценко Т. В., Гончарук В. В. // Цитология и генетика. — 2013. — № 1. — С. 44-49.
6. Fiskesjo G. // Hereditas. — 1985. — 102. — P.99-112.
7. Трахтенберг И.М. Методы изучения хронического действия химических и биологических загрязнителей / Трахтенберг И.М. Тимофиевская Л.А., Квятковская И.Я.// Рига, Зинатис, 1987. 172 с.
8. Балаховский И.С. Руководство по клинической лабораторной диагностике / Под ред. В.В. Меньшикова. —М.: Медицина, 1982, 235 с.
9. Державні санітарні норми та правила "Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною" (ДСанПіН 2.2.4-171-10).
10. Антомонов М.Ю. Математическая обработка и анализ медико-биологических данных. — К.: ФМД, 2006.- 558 с.
11. Arkhipchuk V.V., Goncharuk V.V. // Journal of Water Chemistry and Technology. — 2001. — 23, № 5. — С. 531-544.
12. Goncharuk V.V., Vergolyas M.R., Boltina I.V. // J. Water Chem. and Technol. — 2013. — № 5. — P. 426-435.
13. Верголяс М. Р. Кровь как интегральная система организма // ScienceRise. — 2016. — Т. 2. — №. 1 (19). — С. 7-11.

14. Пат. 201000606 України, МПК G 01 № 33/18 / В.В. Гончарук, І.В. Болтіна, М.Р. Верголяс. Опубл. 25.03.2011. Бюл.№6.
15. Пат. 95717 Україна, МПК G 01 № 33/18. / В.В. Гончарук, М. Р. Верголяс, І. В. Болтіна. Опубл. 25.08.2011, Бюл. № 16.
16. Inoue A, Yokomori K., Tanabe H. et al. / / Int. J. Cancer. — 1997. — P. 1070-1077.
17. Vergolyas M.R. Assessment of ecotoxicological quality of drinking water to the test organisms // Sciences of Europe. — 2016. — №8 (8). — P. 4-8.

References

1. M.R. Vergolyas, M. V. Goncharuk. Evaluation of water quality control using test organisms and their cells // Chemistry and technology of water T.38, №1 2016
2. Vergolyas M.R., Trakhtenberg I.M., Dmitrukha N.N., Goncharuk V.V. Evaluation of the toxic effect of water from various sources on the test organisms / / Factory eksperimentalnoї evolyutsii organizmiv, Zbirnik Naukova Pratsen. m Kiev, 2016, -.. T.19, pp 97-102.
3. M. Vergolyas. Sytogenetic evaluation of the drinking water toxicity // «EUREKA: Life Sciences», 2016. - №1. - 47-54r.
4. State Standard 7387: 2013 DSTU 7387: 2013 Yakist Vod. viznachennya Method cytokine that genotoksichnosti i Vod aquatic rozchiniv on klitinah krovі prisnovodnoї Ribby Danio rerio (Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan). - Enter. 2013
5. Vergolyas M.R., Lutsenko T.V., Goncharuk V.V. // Cytology and Genetics. - 2013. - № 1. - S. 44-49.
6. Fiskesjo G. // Hereditas. - 1985. - 102. - P.99-112.
7. Trachtenberg IM Methods of study of chronic effects of chemical and biological contaminants / Trachtenberg IM Timofievskaya LA Kvyatkovskaya I.YA. // Riga, Zinatis, 1987. 172 p.
8. IS Balakhovsky Guidelines for clinical laboratory diagnostics / Ed. VV Menshikov. -M.: Medicine, 1982, 235 p.
9. Derzhavni sanitarni normalization rules that "Gigienichni vimogi to Vod pitnoї, pryznachenoi for spozhivannya Lyudin" (DSanPiN 2.2.4-171-10).
10. MY Antomonov The mathematical processing and analysis of medical and biological data. - K.: FMD, 2006.- 558 p.
11. Arkhipchuk V.V., Goncharuk V.V. // Journal of Water Chemistry and Technology. - 2001 - 23, number 5. - S. 531-544.
12. Goncharuk V.V., Vergolyas M.R., Boltina I.V. // J. Water Chem. and Technol. - 2013. - № 5. - P. 426-435.
13. Vergolyas MR Blood as an integrated system of the body // ScienceRise. - 2016. - T. 2. - number. 1 (19). - S. 7-11.
14. Pat. 201000606 Ukraine, IPC G 01 number 33/18 / VV Goncharuk, I.V. Boltina, MR Vergolyas. Publ. 25.03.2011. Byul.№6.
15. Pat. UKRAINE 95717, IPC G 01 number 33/18. / VV Goncharuk, M. P. Vergolyas, I. B. Boltina. Publ. 25.08.2011, Bull. Number 16.
16. Inoue A, Yokomori K., Tanabe H. et al. / / Int. J. Cancer. - 1997. - P. 1070-1077.
17. Vergolyas M.R. Assessment of ecotoxicological quality of drinking water to the test organisms // Sciences of Europe. - 2016. - №8 (8). - P. 4-8.

Резюме

АЛЬТЕРНАТИВНИЙ МЕТОД ОЦІНКИ ЯКОСТІ ПИТНИХ ВОД ЗА ДОПОМОГОЮ БІОТЕСТУВАННЯ Верголяс М.Р.

Проведено біотестування і цитогенетичний аналіз для оцінки якості питних вод з різних джерел на організмовому та клітинному рівнях тест-об'єктів представників різних систематичних груп і трофічних рівнів: водний об'єкт — гідра, дафнія, риба і жаба, рослинний об'єкт — цибуля посівна, пшениця і насіння огірків. Критеріями оцінки були загальна токсичність на організмовому рівні, на клітинному рівні — аналіз мітотичного індексу, мікроядерний тест і лейкоцитарна формула крові, зокрема кількісна характеристика лімфоцитів. Методи дослідження ток-

сичності водних зразків дозволили виявити вплив їх на гідробіоти і на рослинні тест-об'єкти, також зміни клітинних структур рослин і гематологічних показників риб, жаб, які можна запропонувати для оцінки якості питних вод. Показана актуальність і перспективність використання тест-об'єктів при оцінці токсичності питних вод, а саме гематологічних показників тест-організмів. У периферичній крові тварин і людини при нормальних фізіологічних умовах організму склад та співвідношення формених елементів знаходиться у стані рівноваги. Порушення взаємовідносин між цими процесами, обумовлене реакцією організму на подразнення токсичного характеру, проявляється в зміні якісного і кількісного складу клітин периферичної крові.

Ключові слова: питна вода, тест-організм, біотестування, периферична кров, цитотоксичність, генотоксичність.

Summary

ALTERNATIVE METHODS TO EVALUATE QUALITY OF DRINKING WATER USING THE BIOASSAY

Vergolyas M.R.

Conducted bioassay and cytogenetic analysis to assess the quality of drinking water from various sources on the organismal and cellular levels test objects of different taxonomic groups and trophic levels: water body — hydra, daphnia, fish and

frog, flora object — onions, wheat seeds and cucumbers. The criteria for evaluation were overall toxicity on organismal level, at the cellular level — analysis of mitotic index, micronucleus test and wbc blood, including quantitative characterization of lymphocyte. Methods of research of toxicity water samples revealed their influence on aquatic plant and test facilities, as changes in cell structures of plants and hematological indices of fish, frogs, which can be offered to assess the quality of drinking water. Shown relevance and potential use of test objects in the evaluation of toxicity drinking water, such as hematological parameters of the test organisms. In the peripheral blood of animals and humans under normal physiological conditions, body composition and value elements are formed in equilibrium.

Violation of the relationship between these processes caused by reaction to the toxic nature of irritation, manifested in changes in qualitative and quantitative composition of peripheral blood cells.

Keywords: drinking water test organism, biological testing, peripheral blood, cytotoxicity, genotoxicity.

*Впервые поступила в редакцию 26.11.2016 г.
Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования*