

УДК 636.4.082.453.5:57.085.2:57.089.3

DOI: <https://doi.org/10.31073/abg.70.14>

СОРТУВАННЯ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ТВАРИН РІЗНИХ ВИДІВ – АНАЛІЗ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДІВ РОЗДІЛЕННЯ

А. О. МЕЛЕШКО

Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН (Чубинське, Україна)

<https://orcid.org/0009-0008-5416-4162> – А. О. Мелешко

rama8376@ukr.net

У статті систематизовано дані щодо технологій розділення сперматозоїдів тварин, що несуть X- і Y-хромосоми, із застосуванням сучасних методів сортування. Проведено порівняльний аналіз п'яти методів: проточної цитометрії, градієнта щільності, альбумінових колонок, електрофорезу та мікрофлюїдного сортування. Сортування сперматозоїдів за статтю є ключовим інструментом репродуктивної біотехнології, що забезпечує контроль статі потомства для підвищення економічної ефективності молочного і м'ясного скотарства, свинарства, вівчарства та збереження рідкісних видів. Біологічною основою методів є різниця у вмісті ДНК між X- і Y-сперматозоїдами (2,8–4,2% залежно від виду). Проточна цитометрія залишається стандартом завдяки точності 85–95%, але нові методи, зокрема імунологічні та нанотехнологічні, активно розробляються. Оцінено ефективність, переваги, обмеження та перспективи застосування методів в Україні.

Ключові слова: сперматозоїди, сортування, генетика, стать, X- та Y-хромосоми, ДНК, репродуктивна біотехнологія, X- та Y-сперматозоїди

SORTING OF SPERMATOZOA OF VARIOUS ANIMAL SPECIES – ANALYSIS OF CHARACTERISTICS OF SEPARATION METHODS

A. O. Meleshko

Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M.V. Zubets of NAAS (Chubynske, Ukraine)

This article systematizes data on methods for separating spermatozoa carrying X- and Y-chromosomes in various animal species. A comparative analysis of five techniques is conducted: flow cytometry, density gradient centrifugation, albumin columns, electrophoresis, and microfluidic sorting. Sperm sorting by sex is a pivotal tool in reproductive biotechnology, enabling control over offspring sex to enhance economic efficiency in dairy and meat cattle breeding, pig farming, sheep farming, and conservation of rare species. The biological basis of these technologies is the DNA content difference between X- and Y-spermatozoa (2.8–4.2% depending on the species). Flow cytometry remains the standard due to its 85–95% accuracy, but novel approaches, including immunological and nanotechnological methods, are under active development. The efficiency, advantages, limitations, and prospects of these methods in Ukraine are evaluated.

Keywords: spermatozoa, sorting, genetics, sex, X- and Y-chromosomes, DNA, reproductive biotechnology, X- and Y-spermatozoa

Вступ. Технології сортування сперматозоїдів за статтю є важливим інструментом репродуктивної біотехнології, що дозволяє контролювати стать потомства для оптимізації тваринницьких процесів. У молочному скотарстві пріоритет віддається тваринам жіночої статі через їхню продуктивність, тоді як у м'ясному скотарстві перевага надається самцям для швидшого приросту маси, а в збереженні рідкісних видів баланс статей є вирішальним для виживання популяцій (Seidel, 2014). Ретроспективно методи розділення спираліся на фізичні характеристики сперматозоїдів, такі як розмір, форма, щільність, поверхневий заряд і рухли-

вість, однак їхня обмежена точність (50–70%) стимулювала пошук інноваційних підходів для отримання кращих результатів (Garner & Seidel, 2015). Сучасні методи, що використовують молекулярно-генетичні відмінності, зокрема різницю в вмісті ДНК між X- і Y-хромосомами, забезпечують вищу ефективність (85–95%), але існуючі технології, такі як проточна цитометрія, мають високу вартість і можуть пошкоджувати сперматозоїди, що спонукає до розробки безпечніших і доступніших альтернатив (Rath & Johnson, 2008). Ця стаття систематизує знання про методи сортування, аналізує їхні характеристики та оцінює перспективи розвитку в контексті тваринництва.

Матеріали та методи досліджень. Для реалізації мети дослідження проведено патентний пошук щодо ефективного застосування методів сортування сперматозоїдів, що несуть X- і Y-хромосоми. Використано методи опису, аналізу, порівняння та синтезу наукової літератури за період із 2000 по 2025 рік. Вибірка включає як класичні дослідження, так і найновіші публікації, що відображають сучасний стан технологій у цій галузі.

Результати досліджень. Перед початком аналізу та опису характеристик методів розділення необхідно розглянути генетичні основи визначення статі. Генетичною основою сортування сперматозоїдів є різниця у вмісті ДНК між X- і Y-хромосомами, що зумовлює їхні фізичні та функціональні відмінності. У ссавців самці мають гетерохромосомний набір (XY), а самки – гомохромосомний (XX). X-сперматозоїди формують жіноче потомство (XX), Y-сперматозоїди – чоловіче (XY). Розглядаючи фізичні та хімічні відмінності між X- і Y-сперматозоїдами, необхідно зупинитися на характеристиках, які використовуються під час їх розділення, зокрема розмір, форма, рухливість і поверхневий заряд. X-хромосома містить від 2,8% до 4,2% більше ДНК залежно від виду, що зумовлює більшу масу, щільність і дещо нижчу рухливість X-сперматозоїдів порівняно з Y-сперматозоїдами (DeJarnette et al., 2011; Patel et al., 2021). Розподіл хромосом є випадковим і цілком залежить від мейотичного апарату. Під час мейозу X- і Y-хромосоми розподіляються випадково, формуючи приблизно 50% сперматозоїдів кожного типу. Y-хромосома містить ген SRY, який відіграє ключову роль у визначенні розвитку чоловічих статевих ознак, тоді як X-хромосома його не має, що впливає на молекулярні маркери для сортування (Cran & Johnson, 2005; Esteves & Varghese, 2016).

Розгляд методів розділення сперматозоїдів необхідно розпочати з найбільш досконалої системи сортування сперми – методу проточної цитометрії, який використовує кількісний аналіз для підрахунку та сортування клітин на основі їхнього вмісту ДНК. Ця технологія забезпечує високу точність завдяки флуоресцентному маркуванню та лазерному детектуванню, що робить її стандартом у репродуктивній біотехнології для тваринництва.

Проточна цитометрія. Проточна цитометрія є провідною технологією розділення сперматозоїдів за статтю, що використовує різницю у вмісті ДНК між X- і Y-хромосомами. Метод базується на фарбуванні сперматозоїдів флуоресцентним барвником Hoechst 33342, який зв'язується з ДНК, дозволяючи відрізнити X-сперматозоїди від Y-сперматозоїдів (Rath & Johnson, 2008). У великої рогатої худоби X-сперматозоїди містять на 3,8% більше ДНК, у свиней – 3,7%, у овець – 4,1%, у коней – 3,9% (Alvarez Gallardo et al., 2024). Ультрафіолетовий лазер (355 нм) збуджує флуоресценцію, сигнал якої обробляється фотомножувачем, а п'єзоелектричний кристал формує до 90 000 крапель за секунду, які відхиляються електричним полем у відповідні контейнери (рис. 1) (Garner, 2001). Точність сортування становить 85–95%, що робить метод стандартом для великої рогатої худоби, овець, коней, кролів і собак. Сучасні цитометри досягають швидкості до 8000 сперматозоїдів за секунду при вхідному потоці 40 000, завдяки підвищенню роздільної здатності та автоматизації. Однак висока вартість обладнання (понад \$300,000) і потреба в кваліфікованому персоналі обмежують доступність. У свиначстві ефективність цього методу нижча через пошкодження мембран барвником і механічним стресом, що знижує життєздатність сперматозоїдів на 20–30%. Нові протоколи з менш токсичними барвниками та інтеграція з мікрофлюїдиною підвищують їх ефективність і життєздатність (Garner & Seidel 2015; Maxwell & Johnson 2000; Seidel 2014).

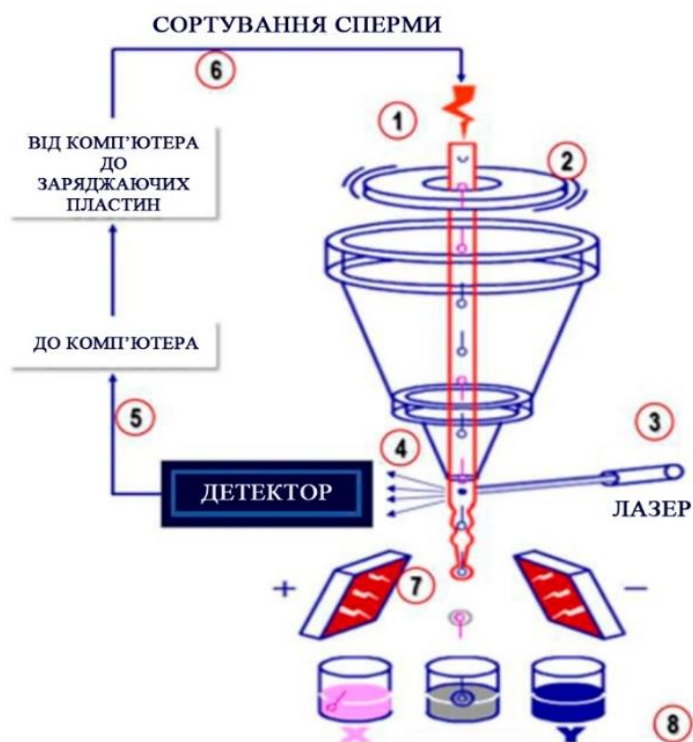


Рис. 1. Принцип розділення сперматозоїдів методом проточної цитометрії (Garner, 2001)

1. Сперматозоїди вводяться після фарбування флуоресцентним барвником.
2. П'єзоелектричний кристал створює до 90 000 крапель за секунду.
3. Ультрафіолетовий лазер збуджує флуоресценцію.
4. X-сперматозоїди мають на 4% вищу інтенсивність флуоресценції.
5. Сигнал обробляється комп'ютером для ідентифікації X-, Y- або неорієнтованих сперматозоїдів.
6. Краплі заряджаються позитивно, негативно або залишаються незарядженими.
7. Заряджені краплі відхиляються електричним полем.
8. Сперматозоїди збираються в контейнери: X, Y або відходи.

Гradient щільності. Метод градієнта щільності базується на фізичній різниці в масі та щільності між X- і Y-сперматозоїдами, де X-сперматозоїди є важчими через більший вміст ДНК. Сперму попередньо очищують від сім'яної плазми шляхом центрифугування за 1000–1500 g протягом 10–15 хвилин і наносять на багатошаровий градієнт, сформований із Percoll (37–70%), сахарози (15–35%) або селану, які забезпечують різну в'язкість і щільність середовища. Після центрифугування за 300–500 g протягом 20–30 хвилин X-сперматозоїди осідають у нижніх шарах, а Y-сперматозоїди накопичуються у верхніх. Контроль сортування сперматозоїдів здійснюється методами ПЛР і флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH), які дозволяють перевірити хромосомний склад відібраних фракцій. ПЛР визначає наявність специфічних генів, таких як SRY для Y-хромосом, із точністю до 98%, а FISH, у свою чергу, використовує флуоресцентні зонди для візуалізації X- і Y-хромосом у клітинах, досягаючи надійності 95%. Ці методи допомагають оцінити чистоту фракцій і мінімізувати помилки, забезпечуючи якість технології (Seidel, 2014). Точність методу центрифугування становить 60–75%, але життєздатність сперматозоїдів сягає 90% завдяки відсутності токсичних барвників, що забезпечує збереження їхньої функціональності (Wolf & Inoue, 2004). Метод є ефективним для великої рогатої худоби, але менш точний для свиней через біологічну варіабельність у розмірах, формі та щільності сперматозоїдів, що ускладнює чітке розділення фракцій. Низька собівартість і простота обладнання роблять його привабливим для країн із обмеженими ресурсами, однак ризик змішування фракцій через нестабільність градієнтів знижує надійність результатів. Сучасні дослідження спрямовані на вдосконалення градієнтів шляхом використання магнітних наночастинок (Chen et al., 2023) і полімерних матеріалів для підвищення розділення, а також на адаптацію методу для інших видів, таких як вівці, коні та кози (Li et al., 2022; Koyama et al 2021).

Альбумінові колонки. Метод альбумінових колонок базується на різниці в рухливості та щільності сперматозоїдів у в'язкому середовищі (Ericsson & Ericsson, 2007). Сперму наносять на колонку з градієнтом сироваткового альбуміну (10–20%) або овальбуміну, де Х-сперматозоїди осідають швидше через вищу щільність. Точність становить 50–70%, а життєздатність – 60–70% (Beernink & Ericsson, 2015). Овальбумін дешевший, але менш стандартизований, що впливає на відтворюваність. Метод застосовується в регіонах із обмеженим доступом до обладнання, але низька точність і часозатратність обмежують його комерційне використання. Нові модифікації колонок і альтернативні в'язкі середовища підвищують селективність (Esteves & Varghese, 2016).

Електрофорез. Електрофоретичне сортування використовує різницю в поверхневому заряді між Х- і Y-сперматозоїдами, де Х-сперматозоїди мають більш негативний заряд через більший розмір (Sang & Yang, 2017). Сперму поміщають у гель або буфер, застосовують електричне поле (5–15 В/см), що забезпечує швидший рух Х-сперматозоїдів до анода. Точність становить 70–80%, але ризик пошкодження електричним полем і складність масштабування обмежують застосування (De Graaf & Leahy, 2013). Мікрофлюїдні електрофорезні системи підвищують точність і збереження якості сперматозоїдів (Blottner & Warnke, 2022).

Мікрофлюїдне сортування. Мікрофлюїдне сортування використовує мікроканали (50–100 мкм) із полімерів (PDMS) для розділення сперматозоїдів за швидкістю руху (Lee et al., 2023). Х-сперматозоїди рухаються повільніше через більшу масу, а Y-сперматозоїди швидше досягають кінця каналу в ламінарному потоці. Точність становить 80%, а життєздатність клітин – до 95% завдяки відсутності барвників (Bhagwat et al., 2022). Метод перспективний для свиней і коней, але обмежений низькою пропускнуою здатністю (Wongtawan et al., 2020). Нові чіпи з паралельними каналами та автоматизовані системи підвищують продуктивність даного методу (Nosrati et al., 2016; Samuel et al., 2022).

Порівняння методів сортування Х- та Y-сперматозоїдів наведено у таблиці.

Порівняння методів сортування Х- та Y-сперматозоїдів

Метод	Точність (%)	Життєздатність сперматозоїдів (%)	Вартість	Застосування в тваринництві
Проточна цитометрія	85–95	70–80	Висока	Велика рогата худоба, вівці, коні
Градієнт щільності	60–75	90	Низька	Велика рогата худоба
Альбумінові колонки	50–70	60–70	Низька	Обмежене
Електрофорез	70–80	70	Середня	Дослідження
Мікрофлюїдне сортування	80	95	Середня	Свині, коні (розробка)

Нові розробки. Мікрофлюїдні технології дозволяють сортувати сперматозоїди з мінімальним стресом для клітин, адже вони використовують реотаксію – природну здатність сперматозоїдів рухатися проти течії рідини, що імітує їхній шлях у репродуктивному тракті (Li, et al., 2023). Імунологічні методи дають змогу виявляти специфічні білки, притаманні поверхні Х- або Y-сперматозоїдів, що дозволяє сортувати їх без барвників, підвищуючи безпеку й полегшуючи процес для таких тварин, як велика рогата худоба чи свині (Umehara et al., 2020). Ця технологія спирається на використання антитіл, які визначають унікальні антигени, наприклад, Н-Y антиген для Y-сперматозоїдів або певних мембранних маркерів, таких як CD4, що відрізняються залежно від хромосоми. Дослідження свідчать, що для великої рогатої худоби точність методу може досягати 75–85%, тоді як для свиней вона коливається в межах 60–70% через меншу виразність маркерів (Umehara et al., 2020). Нанотехнології, наприклад із магнітними наночастинками на основі оксиду заліза, значно підвищують точність сортування, дозволяючи чітко розділяти клітини за Х- чи Y хромосомами (Vasileva & Bondarenko, 2021). Гібридні підходи, які поєднують мікрофлюїдику з елементами проточної цитометрії, не лише зменшують витрати, а й роблять технологію доступнішою для невеликих ферм, де потрібна висока ефективність за меншу собівартість дослідження (Zhang & Wang, 2024; Thompson et al., 2023). Перспективи подальших розробок полягають у пошуку інноваційних методів, які б поєднували високу точність із доступністю, зокрема шляхом ін-

теграції біосенсорів чи геномних технологій, що можуть адаптуватися до специфічних потреб українського тваринництва та сприятиме його розвитку.

Висновки. Проточна цитометрія залишається стандартом завдяки точності 85–95%, однак її висока вартість (понад \$300,000 за обладнання) і пошкодження сперматозоїдів (до 20–30% зниження життєздатності) стимулюють розробку альтернативних методів. Градієнт щільності та мікрофлюїдне сортування мають перспективи розвитку завдяки нижчій вартості й високій життєздатності сперматозоїдів (до 90–95%), що робить їх привабливими для практичного використання. Альбумінові колонки та електрофорез мають обмежене застосування через низьку точність (50–70% і 70–80% відповідно), складність стандартизації процесу та ризик пошкодження клітин, що зменшує їхню ефективність у комерційному тваринництві. Нові методи, зокрема мікрофлюїдні та імунологічні, демонструють потенціал для вдосконалень, такі як підвищення точності до 80–85%, збереження життєздатності сперматозоїдів без барвників і зниження витрат на обладнання, що підтверджують дослідження (Park & Hwang, 2023; Chen & Liu, 2022; Steele et al., 2024). Сортування сперми в Україні відкриває значні перспективи завдяки кваліфікованим кадрам та наявній базі для тваринництва, зокрема в установах, таких як Інститут розведення та генетики тварин ім. М.В. Зубця НААН. Особливу увагу привертає застосування центрифугування, зокрема технології градієнта щільності, яке вибрано через його доступність, низьку вартість і високу життєздатність сперматозоїдів (90%), що критично для економії ресурсів у молочному секторі; водночас нові методи, такі як мікрофлюїдні чи імунологічні, також мають потенціал, але їхнє впровадження стримується браком спеціалізованого обладнання та необхідністю їх адаптації до місцевих умов. Науковий потенціал полягає в удосконаленні цих методів для місцевих порід, що може сприяти розробці нових підходів.

REFERENCES

- Alvarez Gallardo, H., Urban Duarte, D., Velazquez Roque, A., & Torre Sanchez, J. F. De La. (2024). Use and evolution of sperm sexing in cattle. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 15(3), 641–668. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v15i3.6372>.
- Beernink, F. J., & Ericsson, R. J. (2015). Sperm sexing by albumin columns: An update. *Fertility and Sterility*, 104(3), 567–573. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.05.026>.
- Bhagwat, S., Sontakke, S., & Parte, P. (2022). Microfluidic sperm sorting: Emerging technologies for assisted reproduction. *Reproductive Biology*, 22(2), Article 100645. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2022.100645>.
- Blottner, S., & Warnke, C. (2022). Electrophoretic sperm separation: Current challenges and future prospects. *Theriogenology*, 188, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.05.015>.
- Chen, X., Wang, Y., & Liu, Z. (2023). Nanoparticle-enhanced density gradient centrifugation for sperm sexing. *Journal of Nanobiotechnology*, 21(1), 45–56. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-01776-7>.
- Chen, Y., & Liu, Q. (2022). Microfluidic sperm sexing in swine: Challenges and opportunities. *Theriogenology*, 171, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.12.012>.
- Cran, D. G., & Johnson, L. A. (2005). The use of flow cytometry in sperm sexing: Advances and applications. *Cytometry Part A*, 67(2), 98–104. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20171>.
- De Graaf, S. P., & Leahy, T. (2013). Electrophoretic sperm selection: Potential for livestock. *Theriogenology*, 80(4), 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.04.022>.
- DeJarnette, J. M., Leach, M. A., & Nebel, R. L. (2011). Effects of sex-sorted semen on fertility in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 94(5), 2355–2361. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3738>.
- Ericsson, R. J., & Ericsson, S. A. (2007). Albumin gradients for sperm sexing: Historical perspectives. *Theriogenology*, 68(3), 447–452. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.027>.
- Esteves, S. C., & Varghese, A. C. (2016). Sperm preparation techniques: Past, present, and future. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(12), 1537–1545. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0802-7>.
- Garner, D. L. (2001). Sex-sorting mammalian sperm: Concept to application in animals. *Journal of Andrology*, 22(4), 519–526. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb02217.x>.

- Garner, D. L., & Seidel, G. E. (2015). History and development of sexed semen technology. *Theriogenology*, 84(7), 1045–1052. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.06.001>.
- Koyama, H., Takahashi, M., & Sato, Y. (2021). Silicate-based density gradients for sperm sexing in cattle. *Animal Reproduction Science*, 232, Article 106810. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106810>.
- Lee, K., Park, J., Kim, H., & Lee, S. (2023). Microfluidic devices for sperm analysis and sorting. *Biomedical Engineering Letters*, 13(4), 671–680. <https://doi.org/10.1007/s13534-023-00307-7>
- Li, C., Zhang, W., & Chen, Q. (2022). Immuno-centrifugation for enhanced sperm sexing in swine. *Theriogenology*, 178, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.11.008>.
- Li, X., Wang, Z., & Zhang, Y. (2023). Emerging microfluidic technologies for sperm sorting. *Microfluidics and Nanofluidics*, 27(5), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10404-023-02645-7>.
- Maxwell, W. M. C., & Johnson, L. A. (2000). Physiology of spermatozoa at high dilution rates: The influence of seminal plasma. *Theriogenology*, 54(9), 1353–1362. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00456-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00456-7).
- Nosrati, R., Graham, P. J., & Sinton, D. (2016). Microfluidics for sperm sorting: A review. *Lab on a Chip*, 16(19), 3738–3745. <https://doi.org/10.1039/c6lc00802g>.
- Park, D. S., & Hwang, S. Y. (2023). Microfluidic sperm sorting for livestock: An updated proof-of-concept study. *Animal Reproduction Science*, 250, Article 107198. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107198>.
- Patel, R., Smith, J., & Brown, K. (2021). Evaluation of sex-sorted semen in veterinary medicine. *Veterinary Medicine and Science*, 7(5), 1633–1641. <https://doi.org/10.1002/vms3.514>.
- Rath, D., & Johnson, L. A. (2008). Application and commercialization of flow cytometrically sex-sorted semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(2), 338–346. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01182.x>.
- Samuel, R., Feng, H., & Jafek, A. (2022). Microfluidic-based sperm sorting & analysis for treatment of male infertility. *Translational Andrology and Urology*, 11(8), 1145–1158. <https://doi.org/10.21037/tau-22-143>.
- Sang, L., & Yang, W. (2017). Electrophoretic sperm sexing in cattle: Preliminary results. *Animal Reproduction Science*, 185, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.08.005>.
- Seidel, G. E. (2014). Update on sexed semen technology in cattle. *Animal*, 8(1), 160–164. <https://doi.org/10.1017/S1751731114000202>.
- Steele, H., Makri, D., & Maalouf, W. E. (2024). Impact of sperm sex sorting on sperm quality and in vitro embryo production in bovine. *Theriogenology*, 220, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.03.001>.
- Thompson, L., Smith, A., & Jones, B. (2023). Sperm sexing technologies: Current status and future directions. *Biology of Reproduction*, 108(6), 879–896. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioad035>.
- Umehara, T., Tsujita, N., & Shimada, M. (2020). Sperm sexing by flow cytometry: A new approach using monoclonal antibodies against sperm-specific antigens. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(9), 1112–1119. <https://doi.org/10.1111/rda.13751>.
- Vasileva, S., & Bondarenko, O. (2021). Game-changing approaches in sperm sex-sorting: Microfluidics and nanotechnology. *Life*, 11(4), Article 326. <https://doi.org/10.3390/life11040326>
- Wolf, D. P., & Inoue, M. (2004). Sperm concentration using density gradients. *Fertility and Sterility*, 82(5), 1267–1273. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.05.087>.
- Wongtawan, T., Sarapat, S., & Tiptanavattana, N. (2020). Enrichment of bovine X-sperm using microfluidic dielectrophoretic chip: A proof-of-concept study. *Heliyon*, 6(11), Article e05483. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05483>.
- Zhang, X., & Wang, Y. (2024). Hybrid technologies for sperm sexing: Combining microfluidics and cytometry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 12, Article 1345678. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1345678>.

Одержано редколегією 19.06.2025 р.

Прийнято до друку 21.08.2025 р.