

ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНУ SPINK-5 ЯК ГЕНЕТИЧНИЙ ФАКТОР СХИЛЬНОСТІ ДО ОСЕРЕДКОВОЇ СКЛЕРОДЕРМІЇ ТА ХРОНІЧНОГО ЧЕРВОНОГО ВОВЧАКУ

В.В. Савенкова, М.І. Зуєва

ДУ «Інститут дерматології та венерології АМН України», м. Харків

Резюме. На підставі проведених клініко-генетичних досліджень 174 хворих на обмежену склеродермію та 76 хворих на хронічний червоний вовчак з різними стадіями та ступенем тяжкості визначено необхідність дослідження поліморфізму гену SPINK-5. Доведено, що наявність алелі А у хворих на осередкову склеродермію та генотипу АА у пацієнтів із хронічним червоним вовчаком обумовлює підвищений ризик виникнення захворювання у пацієнтів із групи ризику. Наявність генотипу GG, навпаки, знижує ризик розвитку обох захворювань. Генетична складова у хворих чоловіків відіграє більш важливу роль у розвитку цих дерматозів, ніж у жінок.

Ключові слова: обмежена склеродермія, хронічний червоний вовчак, генетична схильність, поліморфізм, ген SPINK-5.

ВСТУП

У теперішній час представлено досить багато доказів існування генетичної схильності до осередкової склеродермії (ОСД) та хронічного червоного вовчака (ХЧВ), про що свідчить сімейна та етнічна схильність до цих захворювань та їх зв'язок з різноманітними генетичними факторами. Серед генетичних факторів, що визначають схильність до розвитку системних захворювань сполучної тканини (або окремих імунологічних змін, що підвищують ризик її виникнення), провідне місце відводиться вивченню генів головного комплексу гістосумісності [2, 5, 9]. Проте не менш важливу роль у кодуванні спадкової схильності до цих захворювань відіграють гени, що відповідають за регуляцію імунної відповіді та процеси розпізнання антигену [7]. Однак широким верствам населення ці імуно-генетичні дослідження недоступні за рахунок їх коштовності та складності методик. Проте, підвищена захворюваність на ОСД і ХЧВ, що спостерігається в останні роки, та збільшення кількості хворих на тяжкі розповсюджені форми і чисельності випадків трансформації обмежених форм у системні потребують необхідності генетичних досліджень у пацієнтів з групи ризику (родичі пробанду, особи, що мають порушення в імунному статусі, робітники, які працюють зі шкідливим факторами, та ін.) [1]. Тому

нами була зроблена спроба щодо визначення генетичного маркера, який дозволяє виявити схильність до виникнення ОСД та ХЧВ, доступного у використанні у практичній медицині.

Пошук таких кандидатних генів ведеться за допомогою різноманітних молекулярно-генетичних методів. Один з підходів полягає у визначенні поліморфізму генів, зокрема, одонуклеотидного поліморфізму. Наявність того чи іншого нуклеотиду в алелі може впливати на активність гену та змінювати властивості білку, який кодує даний ген. Часто зміни у структурі таких генів ведуть до розвитку тих чи інших патологічних процесів.

Ген SPINK-5, що знаходиться у хромосомі 5q та кодує інгібітор серинових протеаз, належить до класу регуляторних генів. Продукт даного гену, інгібітор протеаз відіграє важливу роль у різноманітних морфофізіологічних процесах в організмі: бере участь у протизапальних та антимікробних процесах (імуносупресорні функції, диференціювання Т-лімфоцитів та ін.), контролює диференціювання епітелію, організацію міжклітинного матриксу, регулює ангіогенез та клітинну адгезію [6, 8].

Наведені вище функції гену SPINK-5 дозволяють розглядати його як можливий кандидатний ген, що пов'язаний із розвитком аутоімунних процесів. Тому метою нашої роботи було вивчення

взаємозв'язку одного з видів поліморфізму гену SPINK-5 (G1258A) та виникненням ОСД і ХЧВ.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Однонуклеотидний поліморфізм гена SPINK-5 (G1258A) нами було досліджено у двох груп хворих.

Першу групу складали 174 хворих на ОСД, які були розподілені за стадією (еритематозна, склеротична і атрофічна) та ступенем тяжкості (I – легкий, II – середній, III – тяжкий). Серед них було 39 чоловіків (22,4 %) та 135 жінок (77,6 %). Віковий діапазон пацієнтів становив від 19 до 74 років, середній вік – $42,2 \pm 1,3$ року (жінки – $45,17 \pm 1,36$ року, чоловіки – $31,88 \pm 2,44$ року).

Серед хворих на ОСД 9 осіб (5,2 %) становили хворі на гостру стадію I ступеня, 52 (29,9 %) хворих II ступеня, 28 (16,1 %) хворих III ступеня; склеротичну стадію I ступеня – 4 (2,3 %), II ступеня – 36 (20,7 %), III ступеня – 24 (13,8 %); атрофічну стадію I ступеня – 4 (2,3 %), II ступеня – 15 (8,6 %), III ступеня – 2 (1,1 %).

Друга група складалася з 76 хворих на ХЧВ, серед яких було 35 чоловіків (46,05 %) та 41 жінка (53,95 %). Віковий діапазон пацієнтів становив від 19 до 84 років, середній вік становив $46,3 \pm 2,1$ року, причому найбільша кількість хворих знаходилася у віковій групі 51–60 років (20–35,7 %) та 21–30 років (11–19,6 %). Хворі були досліджені залежно від стадії та ступеня тяжкості.

Серед 67 хворих на ХЧВ при дисконітній та дисемінованій формах у еритематозно-інфільтративній стадії I ступеня тяжкості було 3 (4,5 %), 12 (17,9 %) хворих II ступеня, 17 (25,4 %) хворих III ступеня; гіперкератотично-інфільтративну стадію I ступеня – 1 (1,5 %), II ступеня – 6 (9,0 %), III ступеня – 15 (22,4 %); атрофічну стадію I ступеня – 4 (6,0 %), II ступеня – 8 (11,9 %), III ступеня – 1 (1,5 %).

Контрольною групою служили 96 практично здорових людей віком від 19 до 74 років (37 чоловік і 59 жінок), середній вік – $35,5 \pm 2,88$ року (середній вік жінок – $40,4 \pm 1,32$ року, середній вік чоловіків – $30,7 \pm 1,71$ року).

Виділення ДНК проводилося фенольним методом з лейкоцитів периферичної крові за стандартною методикою [4]. Дослідження генотипів за геном SPINK-5 у хворих виконувалося методом аналізу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів. На першому етапі проводилась ампліфікація (ПЛР) фрагменту гену SPINK-5 [8]. На другому етапі утворені при ампліфікації фрагменти гену піддавали дії рестриктази HphI, що розрізає

сайт з послідовністю GGTGA(N)₈↓. Рестриктазу додавали в розрахунку 3 одиниці на 30 мкл суміші після ПЛР. Зразки інкубували протягом ночі при температурі 37°C. Обрана рестриктаза розрізає фрагмент гену на 2 або 3 фрагменти в залежності від того, який нуклеотид знаходиться у 197-му положенні – аденін чи гуанін. Якщо це аденін, то амплікон SPINK-5 розрізається на дві частини. А коли у 197-му положенні знаходиться гуанін, з'являється ще один сайт рестрикції, який розпізнається ферментом HphI і при цьому утворюються три фрагменти. На третьому, фінальному, етапі проводилась детекція результатів рестрикції за допомогою електрофорезу у 3% агарозному гелі. У даному виді поліморфізму може виявлятися три генотипи: AA, AG, GG. [6].

При обробці результатів використовувалися наступні статистичні показники: критерій Фішера для оцінки різниці між частками відсотків з нерівновеликих вибірок, поліхоричний показник спряженості, k . Отримане значення поліхоричного показника перевіряється на достовірність за допомогою методу χ^2 . Чим ближче значення показника спряженості k до одиниці, тим сильніший зв'язок між досліджуваними показниками [3].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

При проведенні генотипування хворих нами було виділено рестрикційні фрагменти трьох генотипів (AA, AG і GG) гену SPINK-5 (рис. 1).

У ході досліджень нами було виявлено достовірну асоціацію досліджуваних захворювань із наявністю у геномі хворого алелі А та генотипу AA у фрагменті гену SPINK-5. Так серед хворих на ОСД відносна кількість носіїв алелі А (які мають генотипи AA та AG) була помітно вищою ($79,3 \pm 3,1\%$), ніж у контрольній групі ($71,0 \pm 4,6\%$,

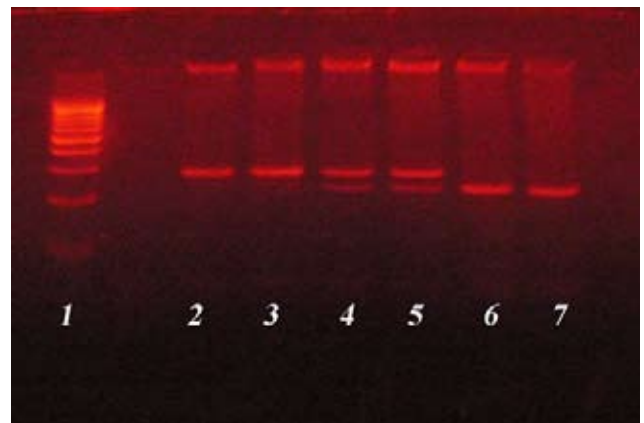


Рис. 1. Електрофореграма генотипів SPINK-5 після рестрикції. 1 – Маркер молекулярної маси; 2, 3 – генотип AA; 4, 5 – генотип AG; 6, 7 – генотип GG

$p < 0,01$). Крім того, дані, наведені у таблиці 1, демонструють, що відносна кількість хворих, що гомозиготні за алеллю G (носії генотипу GG), була достовірно меншою ($20,6 \pm 3,1\%$), ніж кількість гомозигот у контрольній групі ($26,0 \pm 4,5\%$, $p < 0,01$).

У хворих на ХЧВ було знайдено статистично достовірну асоціацію захворювання із наявністю у пацієнтів генотипу AA у фрагменті гену SPINK-5 (табл. 2). У хворих генотип AA зустрічався у $38,1 \pm 5,6\%$, а у контролі у $27,1 \pm 4,5\%$, $p < 0,05$. Асоціація відносно генотипу GG була аналогічна результатам, отриманим у групі хворих на ОСД. Даний генотип у хворих зустрічався достовірно рідше, ніж у здорових людей ($13,2 \pm 3,9\%$ і $26,0 \pm 4,5\%$ відповідно, $p < 0,01$).

Також було показано, що у чоловіків із ОСД генотип AG з достовірною різницею ($p < 0,01$) переважає у групі хворих ($61,5 \pm 7,8\%$ – хворі, $40,5 \pm 8\%$ контроль), а генотип GG навпаки у контролі ($18,0 \pm 6,1\%$ та $43,2 \pm 8,1\%$ відповідно, $p < 0,01$) (табл. 1). У чоловіків, хворих на ХЧВ, переважає генотип AA, який було виявлено у $45,7$

$\pm 8,4\%$ хворих, порівняно з $16,2 \pm 6\%$ у контролі ($p < 0,01$) (табл. 2). Генотип GG у хворих чоловіків із ХЧВ навпаки – частіше зустрічався в контролі ($8,6 \pm 4,7\%$ – хворі, $43,2 \pm 8,1\%$ – контроль, $p < 0,01$). Достовірних розходжень між частотою виявлення різних генотипів SPINK-5 у хворих жінок обох груп порівняно з контролем виявлено не було.

Отримані результати можна пояснити тим, що присутність в гені SPINK-5 алелі А у 1258-му положенні веде до зміни амінокислотного складу інгібітору серинових протеаз, який є продуктом даного гену. Ці зміни у свою чергу зумовлюють зниження його активності. Блок SPINK-5 є одним із ключових регуляторів запальних процесів у організмі людини. Продукт гена SPINK-5 належить до негативних регуляторів імунної відповіді, тому зміна його активності у бік зменшення може зумовити виникнення аутоімунних процесів, що призводять до таких патологій, як ОСД та ХЧВ. Ці порушення також можуть бути пов'язані зі змінами на рівні диференціювання клітин імунної відповіді, яке також контролюється

Таблиця 1

Розподіл генотипів хворих на ОСД в цілому та залежно від статі

Дослідні групи	Генотип SPINK-5					
	AA		AG		GG	
	Частота	%	Частота	%	Частота	%
В цілому						
Хворі	48	27,6	90	51,7	36	20,6
Контроль	26	27,1	45	46,9	25	26,0
Жінки						
Хворі	42	31,1	63	46,7	30	22,2
Контроль	20	33,9	30	50,8	9	15,3
Чоловіки						
Хворі	8	20,5	24	61,5	7	18,0
Контроль	6	16,2	15	40,5	16	43,2

Таблиця 2

Розподіл генотипів хворих на ХЧВ в цілому залежно від статі

Дослідні групи	Генотип SPINK-5					
	AA		AG		GG	
	Частота	%	Частота	%	Частота	%
В цілому						
Хворі	29	38,1	37	48,7	10	13,2
Контроль	26	27,1	45	46,9	25	26,0
Жінки						
Хворі	13	31,7	21	51,2	7	17,1
Контроль	20	33,9	30	50,8	9	15,3
Чоловіки						
Хворі	16	45,7	16	45,7	3	8,6
Контроль	6	16,2	15	40,5	16	43,2

Таблиця 3

Розповсюдження генотипів SPINK-5 у хворих на ОСД в залежності від стадії та ступені тяжкості

Дослідні групи	Частоти генотипів SPINK-5			
	AA	AG	GG	Усього
Хворі на ОСД, еритематозна стадія, I ступінь тяжкості	2	4	3	9
Хворі на ОСД, еритематозна стадія, II ступінь тяжкості	24	12	16	52
Хворі на ОСД, еритематозна стадія, III ступінь тяжкості	5	17	6	28
Хворі на ОСД, склеротична стадія, I ступінь тяжкості	1	3	0	4
Хворі на ОСД, склеротична стадія, II ступінь тяжкості	13	19	4	36
Хворі на ОСД, склеротична стадія, III ступінь тяжкості	6	15	3	24
Хворі на ОСД, атрофічна стадія, I ступінь тяжкості	2	1	1	4
Хворі на ОСД, атрофічна стадія, II ступінь тяжкості	3	5	7	15
Хворі на ОСД, атрофічна стадія, III ступінь тяжкості	0	1	1	2
Усього:	56	77	41	174

продуктом гена SPINK-5. Треба відзначити роль SPINK-5 у формуванні бар'єрної функції шкіри і, зокрема, захисту від ультрафіолетового випромінювання, інфекційних агентів, хімічно активних речовин, несприятливих факторів зовнішнього середовища [10].

Результати генотипування у хворих на ОСД та ХЧВ дає підставу для припущення, що у чоловіків генетична складова у розвитку даних захворювань має більш істотне значення, ніж у жінок, у яких на перший план виходять зовнішні та інші внутрішні фактори (табл. 1, 2).

Нами було проаналізовано зв'язок між генотипом SPINK-5 та формою і ступенем тяжкості ОСД (табл. 3). У результаті дослідження нами було встановлено, що найбільш виражений статистично достовірний зв'язок було знайдено між еритематозною стадією ОСД та генотипом SPINK-5 ($k=0,5$, $\chi^2_{\text{факт}}=22,59$, $\chi^2_{\text{станд}}=18,47$, $p<0,01$). При склеротичній і атрофічній стадіях нами не було виявлено достовірного зв'язку з генотипом SPINK-5 ($k=0,284$, $\chi^2_{\text{факт}}=10,04$, $\chi^2_{\text{станд}}=18,47$, $p<0,05$; $k=0,26$, $\chi^2_{\text{факт}}=6,83$, $\chi^2_{\text{станд}}=18,47$, $p<0,05$, відповідно). Крім того, було виявлено зв'язок між ОСД у цілому та генотипом SPINK-5 ($k=0,51$, $\chi^2_{\text{факт}}=121,45$, $\chi^2_{\text{станд}}=45,2$, $p<0,01$).

Проведений аналіз зв'язку між генотипом SPINK-5 із стадією та ступенем тяжкості ХЧВ (табл. 4) показав, що найбільш виражений статистично достовірний зв'язок було знайдено між генотипом SPINK-5 та ХЧВ в цілому ($k=0,3$, $\chi^2_{\text{факт}}=36,41$, $\chi^2_{\text{станд}}=32,91$, $p<0,01$). При дослідженні окремих стадій статистично достовірної кореляції знайдено не було, а отримані показниками становили: для еритематозно-інфільтративної стадії – $k=0,35$, $\chi^2_{\text{факт}}=6,92$, $\chi^2_{\text{станд}}=18,47$, $p<0,01$; для гіперкератотично-інфільтративної стадії – $k=0,33$, $\chi^2_{\text{факт}}=5,28$, $\chi^2_{\text{станд}}=18,47$, $p<0,01$; для атрофічної стадії – $k=0,19$, $\chi^2_{\text{факт}}=1,1$, $\chi^2_{\text{станд}}=18,47$, $p<0,01$.

Наші результати дозволяють отримати більш високий ступінь передбачуваності виникнення ОСД і ХЧВ у чоловіків та у хворих на ОСД із еритематозною стадією захворювання на підставі аналізу генотипу SPINK-5.

Таблиця 4

Розповсюдження генотипів SPINK-5 у хворих на ХЧВ у залежності від стадії та ступені тяжкості

Дослідні групи	Частоти генотипів SPINK-5			
	AA	AG	GG	Усього
Хворі на ХЧВ, еритематозно-інфільтративна стадія, I ступінь тяжкості	2	1	0	3
Хворі на ХЧВ, еритематозно-інфільтративна стадія, II ступінь тяжкості	4	6	2	12
Хворі на ХЧВ, еритематозно-інфільтративна стадія, III ступінь тяжкості	8	7	2	17
Хворі на ХЧВ, гіперкератотично-інфільтративна стадія, I ступінь тяжкості	1	0	0	1
Хворі на ХЧВ, гіперкератотично-інфільтративна стадія, II ступінь тяжкості	2	3	1	6
Хворі на ХЧВ, гіперкератотично-інфільтративна стадія, III ступінь тяжкості	10	3	2	15
Хворі на ХЧВ, атрофічна стадія, I ступінь тяжкості	1	2	1	4
Хворі на ХЧВ, атрофічна стадія, II ступінь тяжкості	2	6	0	8
Хворі на ХЧВ, атрофічна стадія, III ступінь тяжкості	0	0	1	1
Усього:	30	28	9	67

ВИСНОВКИ

1. Наявність у генотипі хворого або пацієнта з групи ризику алелі А зумовлює більшу імовірність захворювання на ОСД, а наявність генотипу АА зумовлює більшу вірогідність захворювання на ХЧВ. Генотип GG зумовлює знижену схильність захворювання на обидві досліджувані патології.

2. Встановлено, що генетичний поліморфізм у чоловіків, хворих на ОСД та ХЧВ, відіграє досто-

вірно більшу роль у можливому розвитку захворювання, ніж у жінок.

3. У хворих на ОСД при еритематозній стадії встановлено статистично достовірний зв'язок (коефіцієнт спряженості $k = 0,51$) між ступенем тяжкості ОСД та генотипом SPINK-5, а у хворих на ХЧВ виявлено статистично достовірну кореляцію (коефіцієнт спряженості $k = 0,3$) між даним захворюванням та генотипом SPINK-5.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гусева Н.Г. Системная склеродермия: клиника, диагностика, лечение // Рос. журн. кож. и вен. бол. – 2002. – № 4. – С. 5-15.
2. Системная красная волчанка: некоторые вопросы этиологии и патофизиологии / А.И. Дядык, А.Э. Багрий, И.В. Ракитская, Е.В. Щукина // Український ревматологічний журнал. – 2009. – № 2. – С. 61-66.
3. Лакін Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генной инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
5. Ardoin S.P., Pisetsky D.S. Developments of the scientific understanding of lupus // Athr. Res. Ther. – 2008. – № 10. – P. 218-226.
6. Association between polymorphisms in serine protease inhibitor, kazal type 5 and asthma phenotypes in a large German population sample / M. Kabesch, D. Carr, S.K. Weiland, E. von Mutius // Clin. Exp. Allergy. – 2004. – Vol. 34, № 2. – P. 340-345.
7. Current status of lupus genetics / A.L. Sestak, S.K. Nath, A.H. Sawalha, J.B. Harley // Arthr. Res. Ther. – 2008. – Vol. 9. – P. 210-219.
8. Godic A., Dragos V. Successful treatment of Netherton's syndrome with topical calcipotriol. // Europ. J. Dermatol. – 2004. – Vol. 14, № 1. – P. 115-117.
9. Horvitz D.A. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus: past, present and future // Athr. Res. Ther. – 2008. – № 10. – P. 226-235.
10. Lekti fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction / C. Deraison, C. Bonnart, F. Lopez, C. Besson et. al // Mol Biol Cell. – 2007. – Vol. 18, № 9. – P. 3607-3619.

**ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА SPINK-5 КАК
ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ФАКТОР В РАЗВИТИИ
К ОГРАНИЧЕННОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ
ХРОНИЧЕСКОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ**

В.В. Савенкова, М.И. Зуева

Резюме. На основании проведенных клинико-генетических исследований 174 больных ограниченной склеродермией и 76 больных с хронической красной волчанкой с разными стадиями степенью тяжести показана необходимость определения полиморфизма гена SPINK-5. Доказано, что наличие аллели А у больных очаговой склеродермией и генотипа АА у пациентов с хронической красной волчанкой обуславливает повышенный риск возникновения заболевания у лиц из группы риска. Наличие генотипа GG, наоборот, снижает риск

**SPINK-5 GENE POLYMORPHISM
AS A GENETIC FACTOR IN
SCLERODERMA AND CHRONIC LUPUS
ERYTHEMATOSUS DEVELOPMENT**

V.V. Savenkova, M.I. Zuyeva

Rezume. On the ground of genetic researches the necessity of SPINK-5 gene polymorphism analysis has been shown. 174 patients with different stages and severity levels of scleroderma and 76 patients with chronic lupus erythematosus with different stages and severity levels were genotyped. The association between allele A, AA genotype and GG genotype of SPINK-5 gene and studied pathologies was shown in the work. Allele A causes high-risk of scleroderma, AA genotype causes high-risk of chronic lupus erythematosus and genotype GG causes reducer risk of occurrence of

развития обоих заболеваний. Генетическая составляющая у больных мужчин играет более важную роль в развитии этих дерматозов, чем у женщин.

studied diseases. In men genetic factors play more important role in development of scleroderma and chronic lupus erythematosus, than in women.

Ключевые слова: ограниченная склеродермия, хроническая красная волчанка, генетическая предрасположенность, полиморфизм, ген SPINK-5.

Keywords: scleroderma, chronic lupus erythematosus, genetic predisposition, polymorphism, SPINK-5 gene.

Новини медицини

Группа американских ученых обнаружила молекулу, которая способна блокировать передачу ВИЧ

Группа американских ученых обнаружила молекулу, которая способна блокировать передачу ВИЧ. Исследователи сообщают, что этот превентивный агент в будущем можно будет использовать в форме наружной мази с целью предотвращения инфицирования опасным для жизни вирусом. Ученые уже давно установили, что после проникновения ВИЧ в организм человека он стремится закрепиться в нем. Протеин, содержащийся в мужской жидкости, – спермовый усилитель вирусного заражения, или SEVI, – делает вирус в 100 тысяч раз более заразным, усиливая способность ВИЧ прикрепляться к белым кровяным тельцам, что разрушает иммунную систему носителя.

Теперь американские исследователи обнаружили, что молекула под названием сурфен может нарушать работу SEVI. Уорнер Грин, директор Института вирусологии и иммунологии им. Гладстона в Сан-Франциско (Калифорния, США), сообщил, что сурфен, который был впервые описан исследователями в 1939 году, является одновременно противовоспалительным и антибактериальным агентом. Профессор пояснил, что сурфен предотвращает инфекцию путем связывания себя с вирусом СПИДа и клетками крови, подверженными нападению.

Ранее исследовательская работа в области разработки бактерицидных средств – кремов и гелей, содержащих агенты антиВИЧ, которые обычно используются в качестве профилактики заражения при сексуальных отношениях, не принесла успеха, и этот метод не зарекомендовал себя как достаточно эффективная мера в борьбе с распространением вируса СПИДа. Однако теперь Грин надеется, что сурфен даст исследователям шанс на успех. «Я думаю, что концепция использования агентов, которые воздействуют не только на сам вирус, но и на те факторы в самом организме, которые увеличивают шансы заражения, может привести к весьма эффективному терапевтическому результату», – сказал профессор.

По словам Уорнера Грина, аналогичные (так называемые коктейльные) терапии оказались эффективным оружием в лечении больных СПИДом: «Точно так же, как и с проведением антиретровирусной терапии для лечения ВИЧ-инфицированных пациентов, мы могли бы предотвратить передачу ВИЧ, используя комбинации бактерицидов».

CyberSecurity