

01
Моделирование типов связывания алкалоида коралина с ДНК

© К.Г. Куликов,¹ Т.В. Кошлан²

¹ Санкт-Петербургский государственный политехнический университет,
195251 Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет,
199034 Санкт-Петербург, Россия
e-mail: kulikov_kg@hotmail.ru

(Поступило в Редакцию 1 октября 2014 г.)

Исследовано взаимодействие синтетического протоберберинового алкалоида коралина с двойной спиралью ДНК тимуса теленка в водном солевом растворе методами оптической абсорбционной спектроскопии и спектрополяриметрии. Рассмотрены зависимости спектральных характеристик алкалоида от соотношения концентрации пар оснований ДНК к концентрации молекул алкалоидов. С помощью модифицированных уравнений МакГи и фон Хиппеля определены параметры связывания алкалоида коралина с двойной спиралью ДНК.

Введение

Синтез эффективных малотоксичных противоопухолевых препаратов на основе алкалоидов природного происхождения является важной задачей современной медицины. Для таких препаратов актуальны алкалоиды, которые способны выборочно накапливаться в клетках опухолей и образовывать нековалентные комплексы с нуклеиновыми кислотами.

Следует отметить, что в большинстве работ, посвященных проблеме связывания алкалоида коралина с ДНК, отсутствуют количественные методы для описания различных типов связывания лиганда (алкалоида коралина) на макромолекуле ДНК и РНК [1–5]. Хотя очевидно, что в реальной клеточной системе это является исключением, чем правилом.

Анализ экспериментальных данных при наличии нескольких мест связывания алкалоида коралина с макромолекулой ДНК с целью определения параметров связывания представляет большую трудность. Во-первых, это связано с отсутствием однозначных формул, во-вторых, с затрудненностью анализа изотермы связывания [6].

Коралин — важный алкалоид группы протоберберинов. На рис. 1 приведено строение синтетического протоберберинового алкалоида коралина.

Следует отметить, что алкалоид коралина демонстрирует противолейкемическую активность и, хотя его противоопухолевая активность не очень высока, он является перспективным соединением из-за его низкой токсичности [3]. Алкалоид коралина эффективен против L1210 лимфомы и P388 лимфоцитарной лейкемии [5].

Взаимодействие алкалоида коралина с нуклеиновыми кислотами исследовалось в [3–5,7], но выводы о способе связывания неоднозначны. Алкалоид коралина, как правило, взаимодействует с ДНК как интеркалятор, но возможно также и внешнее связывание с фосфатными группами [7]: взаимодействие с ДНК осуществляется путем интеркаляции между двумя соседними парами

оснований в двойной спирали ДНК. Также взаимодействие химически-активных соединений с макромолекулой ДНК может происходить не только посредством интеркаляции, но и путем внешнего связывания. Таким образом, может существовать внешнее связывание и интеркаляция. Видимые спектры поглощения алкалоида коралина, которые обладают несколькими гетероциклическими хромофорами, изменяются, когда они связаны с нуклеиновыми кислотами. В частности, у связанного алкалоида коралина с ДНК спектр поглощения, как правило, смещается в длинноволновую область и его величина максимального поглощения уменьшается. Такое поведение не является специфическим для конкретного типа связывания, так как оба типа взаимодействия показывают характерно близкие спектральные характеристики, тем не менее они могут быть использованы для изучения сродства и специфичности связывания алкалоида коралина. Следует отметить, что спектры поглощения зависят от метода проведения исследования,

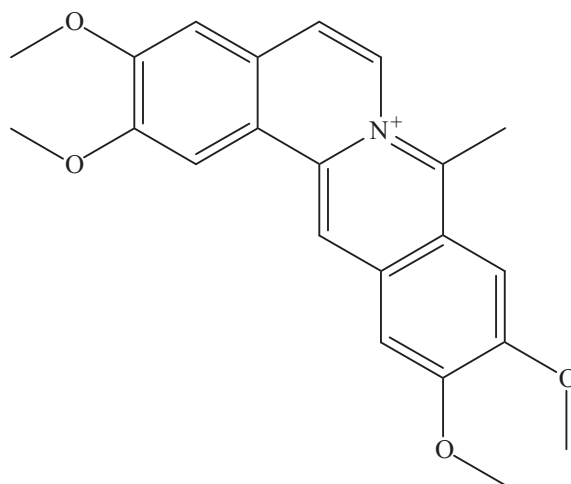


Рис. 1. Строение синтетического протоберберинового алкалоида коралина.

от соотношения концентраций ДНК и алкалоида коралина.

В настоящей работе определены параметры связывания алкалоида коралина с ДНК при помощи уравнений МакГи и фон Хиппеля, модификация которых разработана в настоящей работе.

Работа состоит из двух частей. В первой части получены модифицированные уравнения МакГи и фон Хиппеля для антикооперативного связывания. Вторая часть посвящена постановке описания эксперимента.

1. Постановка задачи и математические модели взаимодействия алкалоида коралина с ДНК

1.1. Расчет параметров связывания

Классическим уравнением для определения параметров связывания является уравнение Скотчарда [6]:

$$\frac{r}{C_f} = K(1 - r), \quad (1)$$

где $r = Cb/N$ — отношение концентрации связанных лигандов (молекул алкалоида коралина) (Cb) к полной концентрации мест связывания (N), C_f — концентрация свободных лигандов, K — константа связывания.

Данная зависимость должна быть линейной, и константу связывания определяют по величине наклона прямой. Однако в ряде вариантов эта зависимость может быть нелинейной, особенно когда молекула имеет более, чем одно место связывания с ДНК [6].

МакГи и фон Хиппель развили подход Скотчарда на случай, когда коралин может занимать более, чем одно место связывания. Уравнения МакГи и фон Хиппеля имеют следующий вид [8]:

— для некооперативного связывания

$$\frac{r}{C_f} = K(1 - nr) \left[\frac{(1 - nr)}{1 - (n - 1)r} \right]^{n-1}, \quad (2)$$

— для кооперативного связывания

$$\frac{r}{C_f} = K(1 - r) \left[\frac{(2w - 1)(1 - nr) + r - R}{2(w - 1)(1 - nr)} \right]^{n-1} \times \left[\frac{(1 - (n + 1)r + R)}{2(1 - nr)} \right]^2, \quad (3)$$

где w — параметр кооперативности ($w > 1$ — связывание кооперативное, $w = 1$ — связывание некооперативное, $w < 1$ — антикооперативное), n — количество исключенных мест при связывании одной молекулы алкалоида коралина с ДНК

$$R = \sqrt{(1 - (n + 1)r)^2 + 4wr(1 - nr)}. \quad (4)$$

1.2. Привязка к оптическому параметру

Концентрацию свободных или связанных молекул коралина нельзя наблюдать непосредственно в момент эксперимента. В этом случае в процессе эксперимента измеряют соответствующие зависимости оптических параметров.

Рассмотрим два типа состояния алкалоида коралина. Такому условию отвечает один тип места связывания молекул алкалоида коралина на макромолекуле ДНК.

В случае, если алкалоид коралина может пребывать только в одном из двух состояний: свободном или связанном, тогда в этом случае имеем [8]

$$A = \frac{C_f}{C} A_f + \frac{Cb}{C} Ab, \quad (5)$$

где A — оптический параметр смеси, C — полная концентрация, A_f — оптический параметр свободных лигандов (молекулы алкалоида коралина), Cb — концентрация связанных лигандов (молекулы алкалоида коралина). Зная A_f и Ab , можно вычислить C_f и Cb и перейти к координатам Скотчарда для последующей аппроксимации экспериментальных данных.

Теперь рассмотрим случай, когда у нас три состояния алкалоида коралина. Такому условию отвечают два места связывания. Если молекула коралина может находиться только в одном из трех состояний: свободное состояние, связанный с первым или со вторым типом связывания на макромолекуле ДНК, то выражение для оптического параметра имеет следующий вид [8]:

$$A = \frac{C_f}{C} A_f + \frac{Cb_1}{C} Ab_1 + \frac{Cb_2}{C} Ab_2, \quad (6)$$

где Ab_1, Ab_2 — оптические параметры алкалоида коралина, связанные с местами первого и второго типов, Cb_1, Cb_2 — их концентрация, A_f — оптический параметр водного солевого раствора лиганда алкалоида коралина (линия спектра под номером 1 на рис. 2), Ab — оптический параметр водного солевого раствора лиганда коралина и ДНК, при котором все молекулы коралина считаются связанными с ДНК. Данный параметр определяется путем экстраполяции обратной величины концентрации к поглощению (на рис. 3 этот параметр обозначен как Ab по оси Oy).

Для данного случая сложно определить концентрацию коралина первого и второго типов.

Рассмотрим модельные уравнения для случая двух типов мест связывания.

В данном варианте не рассматривается процесс прямого перехода связанных молекул алкалоида коралина с места связывания „1“ в место связывания „2“. Под первым типом связывания мы будем подразумевать в настоящей работе внешнее связывание, а под вторым типом связывания — интеркаляцию.

Процесс связывания описывается системой из двух уравнений. Вид уравнений и количество множителей

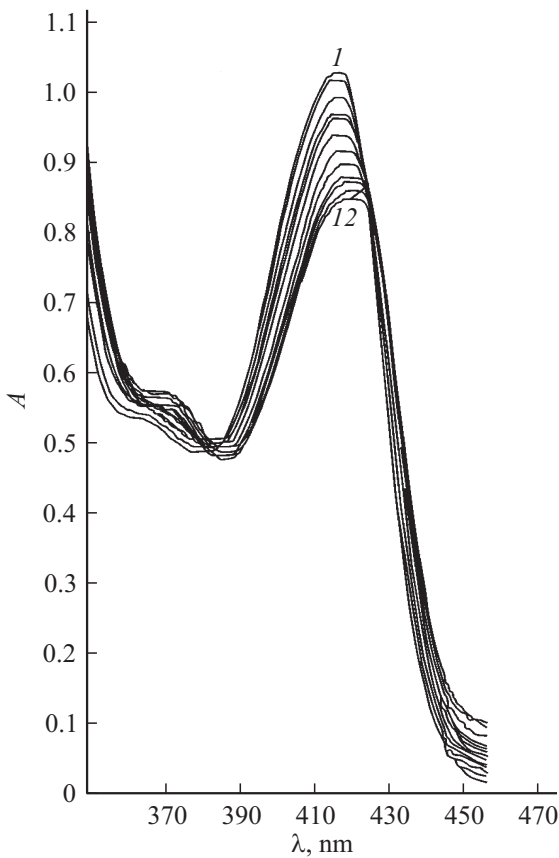


Рис. 2. Спектр поглощения водного раствора алкалоида коралина и комплекса алкалоид коралин + ДНК при различных концентрациях ДНК. Концентрация алкалоида коралина составила $5.2 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$ в водно-солевом растворе NaCl с ионной силой $\mu = 0.001$.

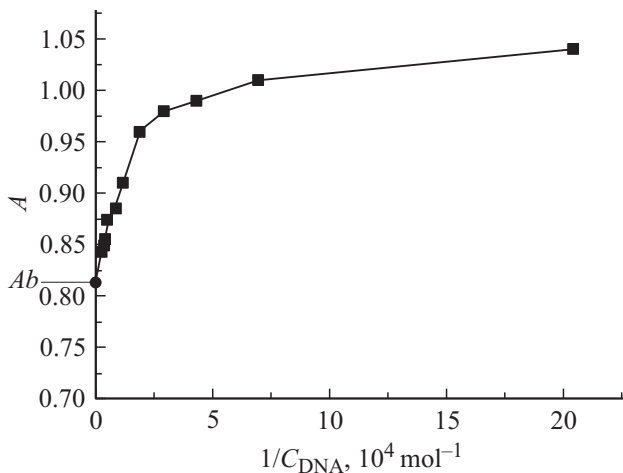


Рис. 3. График предполагаемой зависимости обратной величины концентрации к оптическому параметру смеси, полученный с помощью экстраполяции.

зависят оттого, является ли процесс связывания независимым или кооперативным. Если N — концентрация пар оснований ДНК, то первому типу связывания с

фосфатами, отвечает $2N$ мест связывания согласно строению макромолекулы ДНК, второму типу связывания — интеркаляция, которой отвечает N мест связываний.

Система двух модифицированных уравнений Скетчарда описывает два независимых процесса связывания молекулы алкалоида коралина, которая занимает одно место связывания [8]:

$$Cb_1 = K_1 C_f (2N - n_1 Cb_1),$$

$$Cb_2 = K_2 C_f (N - n_2 Cb_2), \tag{7}$$

где K_1, K_2 — соответствующие константы связывания, отвечающие первому и второму типам связывания, N — концентрация пар оснований ДНК, n_1 — количество исключенных мест при внешнем связывании молекулы алкалоида коралина с макромолекулой ДНК, n_2 — количество исключенных мест связывания при интеркаляции ДНК молекулой алкалоида коралина. Отметим, что данные уравнения отображают независимый процесс связывания.

Для экспериментальных данных наиболее удачная аппроксимация была получена с использованием модифицированных уравнений МакГи и фон Хиппеля, которые были разработаны в настоящей работе, для случая зависимых процессов связывания молекулой алкалоида коралина.

Были сделаны следующие предположения:

- интеркаляция между парами оснований разрешена только при условии, что фосфаты на этом промежутке не связаны с молекулой алкалоида коралина,
- связывание с фосфатами разрешено, когда соответствующие пары азотистых оснований не связаны с молекулой алкалоида коралина,
- между двумя молекулами алкалоида коралина, которые интеркалируют основания, должно быть не меньше, чем $n - 1$ свободных промежутков.

Уравнение связывания имеет вид [8]

$$Cb = KC_f N_f, \tag{8}$$

где Cb — концентрация связанных молекул алкалоида коралина, а множитель N_f имеет следующий вид:

$$N_f = (N - nCb)P_f, \tag{9}$$

и N_f определяет концентрацию связанных мест. Так как процессы зависимые, то необходимым условием связывания молекулы алкалоида коралина с участком на макромолекуле ДНК является наличие свободных смежных участков с местом связывания. Вероятность, что смежные места свободны, выражается следующим соотношением:

$$P_f = \left[1 - \frac{Cb_{(another)}}{N_{(another)}} \right]^s, \tag{10}$$

s — количество смежных мест связывания, P_f — величина вероятности, отвечающая каждому определенному типу связывания [8].

Рассмотрим процесс внешнего связывания молекулы алкалоида коралина с фосфатами. Определим величину вероятности, которая характеризует наличие свободного участка пары азотистых оснований, граничащей с данным внешним (фосфатным) участком макромолекулы ДНК. Согласно строению макромолекулы ДНК, имеется два таких смежных участка азотистых оснований по одному с каждой стороны от фосфодиэфирной связи.

Введем вероятность для первого типа связывания (по фосфатам)

$$P_{ph} = (1 - Cb_2/2N)^2. \quad (11)$$

Рассмотрим процесс интеркаляции. Вероятность, что оба участка фосфодиэфирной связи, граничащие с данным участком азотистой пары основания, свободны, определяется следующим образом:

$$P_{in} = (1 - Cb_1/N)^2. \quad (12)$$

Таким образом, с учетом выражений (1)–(12) получим систему уравнений, которая отвечает вышеприведенным условиям:

$$Cb_1 = K_1 C_f (2N - n_1 Cb_1) (1 - Cb_2/2N)^2, \quad (13)$$

$$Cb_2 = K_2 C_f (N - n_2 Cb_2) (1 - Cb_1/N)^2 \times \left[\frac{(2w - 1)(1 - nr) + v - R}{(2(w - 1)(1 - nr))} \right]^{n-1} \times \left[\frac{(1 - (n + 1)r + R)}{(2(1 - nr))} \right]^2,$$

$$R = \sqrt{(1 - (n + 1)r)^2 + 4wr(1 - nr)},$$

$$A = C_f / CA_f + Cb_1 / CA_{b1} + Cb_2 / CA_{b2},$$

$$C = C_f + Cb_1 + Cb_2, \quad (14)$$

где параметр $w < 1$, так как связывание антикооперативное согласно экспериментально построенной изотерме Скетчерда (рис. 4).

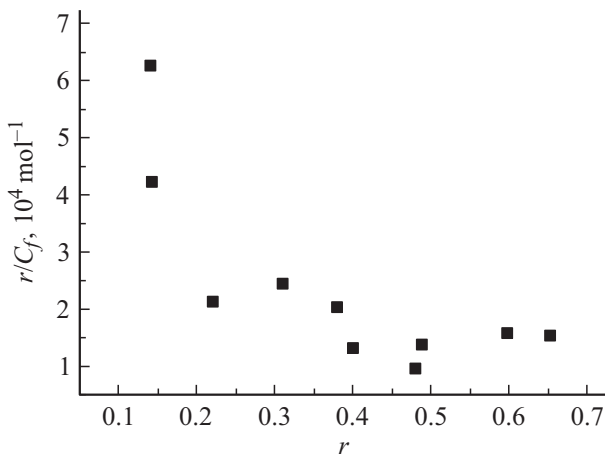


Рис. 4. Кривая Скетчерда.

2. Методы эксперимента

В настоящей работе все измерения спектров поглощения проводились с помощью двухлучевого регистрирующего спектрофотометра Specord UV VIS.

2.1. Исследование протоберберинового алкалоида коралина

В экспериментах использовалась ДНК из тимуса теленка фирмы „Serva“. Концентрация ДНК определялась по методу А.С. Спирина. Средняя молярная масса пары нуклеотидов составила 650 Da. Коэффициент экстинкции коралина был определен ранее с помощью спектрофотометрического метода и составил $\epsilon = 11200 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ на максимуме поглощения $\lambda = 420 \text{ nm}$.

Алкалоид коралина в виде микрокристаллического порошка растворяли при комнатной температуре, подогревая до 35°C в растворе соли NaCl с ионной силой $\mu = 0.001$. Далее, была приготовлена серия растворов лиганда (алкалоида коралина) и лиганда (алкалоида коралина) с ДНК и исследовалось их взаимодействие, при этом поддерживалась постоянная концентрация исследуемого лиганда (алкалоида коралина).

Отметим, что наиболее удобным подходом, при котором поддерживается постоянная концентрация, является, как правило, экспериментальный подход, связанный с тем, что достигается постоянная концентрация лиганда (алкалоида коралина), а концентрация ДНК постепенно увеличивается.

В первом опыте в раствор с постоянной концентрацией алкалоида коралина добавлялся инъекционно раствор ДНК + алкалоид коралин. Таким образом, поддерживалась постоянная концентрация алкалоида в растворе. Полученный раствор был исследован в кварцевой кювете спектрофотометра Specord UV VIS. Концентрация алкалоида коралина в эксперименте составляла $5.2 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$.

Регистрация спектров поглощения проводилась на спектрофотометре в диапазоне 300–500 nm.

2.2. Спектроскопические исследования

Взаимодействие ДНК с алкалоидом коралина было исследовано при использовании абсорбционной спектроскопии.

Алкалоид коралина определялся в спектре поглощения с максимальной линией поглощений при $\lambda = 420 \text{ nm}$ и плечом в районе $\lambda = 405 \text{ nm}$.

При этом наблюдались гипохромный и батохромный эффекты в абсорбционном спектре коралина (рис. 2).

Отметим, что на рис. 2 один из спектров представляет собой спектр поглощения свободного алкалоида коралина (на рис. 2 он отмечен как спектр с номером 1) с концентрацией $C_{\text{max}} = 5.2 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$, спектр с наибольшей концентрацией ДНК и алкалоида коралина представлен кривой поглощений (на рис. 2 он отмечен как спектр с

номером 12) концентрация ДНК $C_{\max} = 3.355 \cdot 10^{-4}$ mol. При этом промежуточные спектры образованы посредством добавления постепенно увеличивающейся концентрации ДНК в молях $\times 10^{-5}$: 0.49, 1.449, 2.36, 3.37, 5.26, 8.61, 12.31, 18.22, 24.68, 32.4.

При добавлении ДНК с возрастающей концентрацией наблюдались гипохромный сдвиг и изобестические точки в районе $\lambda = 431$ и 385 nm. Предположительно, что наблюдаемое смещение спектральной полосы в длинноволновую область может возникнуть по причине перекрывания π -электронного облака лиганда (алкалоида коралина) с парой оснований ДНК, что подтверждает интеркаляционное связывание лиганда (алкалоида коралина) и ДНК.

Алкалоид коралина может интеркалировать пары оснований ДНК, являясь плоской гидрофобной молекулой, которая может взаимодействовать с неполярным окружением.

В каждой серии раствора наблюдался прогрессивный сдвиг максимума поглощения в сторону более длинных волн с увеличением содержания нуклеиновых кислот, и поглощение в максимуме постепенно уменьшалось. Эти спектральные изменения позволяют обеспечить удобные методы оценки и количественного образования комплекса взаимодействия ДНК с лигандом, в частности с алкалоидом коралином.

В настоящей работе все спектры нескольких растворов одного опыта проходят через две изобестические точки, отвечающие двум различным длинам волн.

Считается, что наличие одной изобестической точки говорит о существовании только двух форм лиганда, в данном случае имеется в виду: „свободный“ и „связанный“ лиганды (алкалоид коралин). Тем не менее существование изобестической точки не является доказательством, что только две формы присутствуют в растворе. Так же в растворе может существовать более, чем один тип связывания лиганда.

С помощью данных, полученных при спектрофотометрическом титровании, были произведены расчеты для построения графика Скетчарда (рис. 4). При этом кривые изотермы (рис. 5) имеют сложный характер, а не вид прямой, что говорит о сложном антикооперативном связывании лиганда (алкалоида коралина) с ДНК.

2.3. Некоторые особенности координат Скетчарда

Следует отметить, что в зависимости от вида графика можно сделать некоторые выводы о характере взаимодействия лиганда с макромолекулой ДНК.

На приведенном рис. 5 величина r поднимается по мере того, как лиганд (алкалоид коралин) занимает свободные места на ДНК, пока в конце концов не будет максимального приближения к пределу, когда все доступные сайты связывания на ДНК будут заполнены.

В экспериментальной ситуации кривая Скетчарда часто бывает изогнута, когда показатель r умеренно боль-

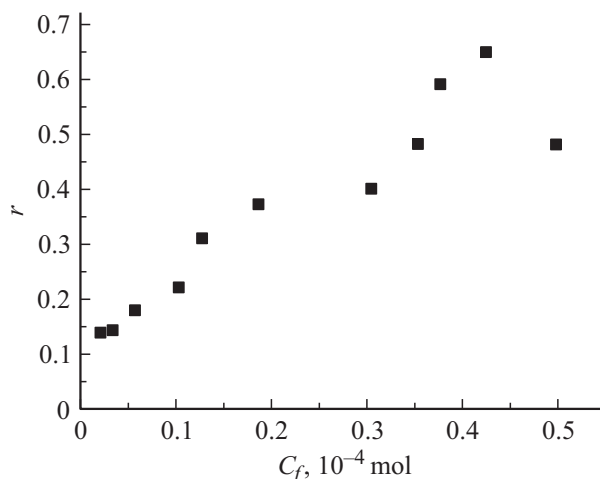


Рис. 5. Изотерма связывания.

шой. Отсюда следует, что данный подход недостаточен для описания взаимодействия ДНК с лигандом (алкалоид коралина) [6].

Также возможно опосредованное взаимодействие лиганда в процессе связывания с макромолекулой ДНК. Взаимодействия между лигандами могут способствовать связыванию дополнительных лигандов или препятствовать их дальнейшему связыванию [6]. Связывание с конкретной базовой парой может исключать связывание с соседним участком, что возможно, вследствие стерических затруднений в боковой группе, связанной с положением молекулы лиганда в предыдущем участке.

2.4. Исследование спектров кругового дихроизма (КД)

Спектры КД были получены на дихрографе фирмы Jobin-Yvon Mark-4. Полученные электронные данные обрабатывались в программе Origin7.0.

Спектрополяриметрическое титрование растворов ДНК растворами лиганда в солевом растворе NaCl с ионной силой $\mu = 0.001$ проводили в диапазоне длин волн: $\lambda = 220-450$ nm. Концентрация ДНК была постоянна во всех растворах и составляла $3.2 \cdot 10^{-5}$ mol.

Конформационные изменения, соотносимые со связыванием алкалоида коралина с двойной спиралью ДНК, были исследованы также с помощью метода кругового дихроизма.

Кривая спектра двойной спирали ДНК представлена кривой 1 на рис. 6. Она характеризуется полосами разного знака в ультрафиолетовой области спектра с максимальной положительной интенсивностью в области длины волны 280 nm.

При увеличением концентрации алкалоида коралина наблюдалось значительное изменение формы спектральных кривых: интенсивность отрицательной полосы возрастала, а интенсивность положительной полосы уменьшалась. Форма спектра менялась с увеличением

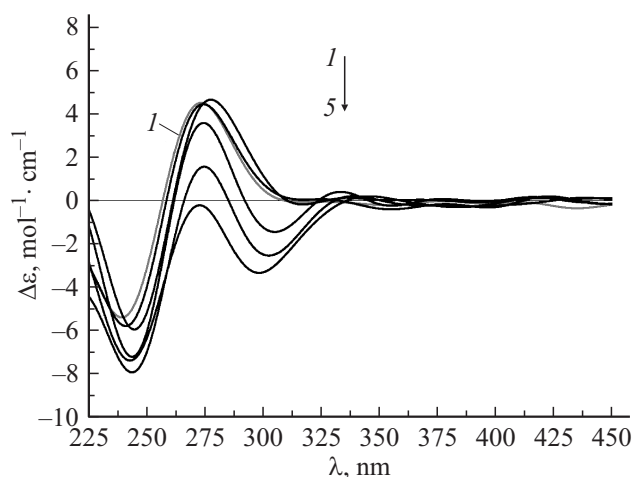


Рис. 6. Спектры КД водного раствора ДНК с концентрацией $3.2 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$ при различной концентрации алкалоида коралина от $2 \cdot 10^{-5}$ до 10^{-4} mol в водно-солевом растворе NaCl с ионной силой $\mu = 0.001$.

концентрации лиганда (алкалоида коралина): от $2 \cdot 10^{-5}$ до 10^{-4} mol .

Увеличение значения отношений концентрации лиганда (алкалоида коралина) к концентрации ДНК приводит к значительному росту значения КД отрицательной полосы и исчезновению положительной спектральной полосы.

Появление КД лиганда (алкалоида коралина) свидетельствует о его взаимодействии с двойной спиралью ДНК. Поскольку в области длин волн, превышающих 300 nm полосы поглощения ДНК и лиганда (алкалоида коралина), перекрываются, то значительные изменения спектра КД в этой области могут быть вызваны как изменением в конформации молекулы ДНК, так и появлением КД лиганда (алкалоида коралина), сопряженного с соответствующей полосой поглощения. Значительное увеличение интенсивности этой полосы с ростом концентрации лиганда (алкалоида коралина) свидетельствует о продолжении процесса связывания лиганда (алкалоида коралина) с макромолекулой ДНК.

2.5. Параметры комплексообразования

Исследования проводились в ультрафиолетовом и видимом диапазонах. Спектр алкалоида коралина имел максимальный пик на длине волны 420 nm.

При добавлении в раствор алкалоида коралина раствора ДНК в спектре поглощения алкалоида коралина наблюдался существенный гипохромизм и небольшой сдвиг максимума поглощения в сторону более длинных длин волн.

В данном случае наблюдаемый гипохромизм явился как следствие взаимодействия π -систем молекул, размещенных параллельно. При этом гипохромизм указывает на интеркаляцию или внешний стэкинг как на возможные механизмы связывания.

Для аппроксимации экспериментальных данных была принята модель с использованием модифицированных уравнений Скотчарда и МакГи и фон Хиппеля для антикооперативного связывания, полученная в настоящей работе. Она учитывает два зависимых процесса связывания лигандов (алкалоида коралина):

1. внешнее связывание с фосфатами,
2. интеркаляцию двойной спирали ДНК.

Отметим, что между двумя интеркалированными парами оснований должно быть не меньше чем $n - 1$ свободных мест. Такой модели соответствует система уравнений (13)–(14), в которых учтены эти условия.

В результате аппроксимации экспериментальных данных в соответствии с системой уравнений (13)–(14) были получены значения констант связывания $K_1 = 3.5 \cdot 10^{-4} \text{ mol}^{-1}$, $K_2 = 10^{-5} \text{ mol}^{-1}$, параметры $n_1 = 5$, $n_2 = 2$ и $w = 0.7$. Следует отметить, что значение параметра $n_2 = 2$ означает, что одна молекула занимает две пары оснований ДНК, что соответствует интеркаляционной модели связывания.

3. Заключение

В настоящей работе были выведены модифицированные уравнения МакГи и фон Хиппеля для антикооперативного связывания, которые позволили получить:

— константы связывания, отвечающие двум различным взаимно связанным процессам взаимодействия лиганда, в частности алкалоида коралина с нуклеиновыми кислотами;

— численные оценки количеств исключенных мест, при связывании одной молекулы лиганда (алкалоида коралина) с двухспиральной молекулой ДНК в зависимости от типа связывания, а также фактор кооперативности.

Таким образом, было выполнено математическое моделирование различных вариантов связывания молекулы алкалоида коралина с макромолекулой ДНК. Впервые получены модифицированные уравнения на основании преобразованных ранее известных уравнений МакГи и фон Хиппеля в зависимости от типа связывания лиганда алкалоида коралина с макромолекулой ДНК.

Авторы считают своим долгом выразить благодарность кафедре „Молекулярная биофизика“ физического факультета СПбГУ за предоставленную возможность проведения эксперимента, в частности канд. физ.-мат. наук, доц. Е.Б. Морошкиной.

Список литературы

- [1] Giri P., Kumar G.S. // Mol.BioSyst. 2008. Vol. 4. P. 341–348.
- [2] Pandya P., Kuma S., Kumar G.S. // Mol.BioSyst. 2009. Vol. 5. P. 244–254.
- [3] Maiti M., Kumar G.S. // Journal of Nucleic Acids. 2010. Vol. 2010. P. 1–23.

- [4] *Maiti M., Kumar G.S.* // Medicinal Research Reviews. 2007. Vol. 27. N 5. P. 649–695.
- [5] *Bhadra K., Kumar G.S.* // Medicinal Research Reviews. 2011. Vol. 31. N 6. P. 821–862.
- [6] *Dougherty G., Pigram W.J.* // Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 1982. Vol. 12. N 2. P. 103–132.
- [7] *Taira Z., Matsumoto M., Ishida S., Ichikawa T., Sakiya Y.* // Chem. Pharm. Bull. 1994. Vol. 42. N 8. P. 1556–1566.
- [8] *Гуменюк В.Г., Башмакова Н.В., Кутовой С.Ю., Яцук В.М., Заика Л.А.* // УФЖ. 2011. Т. 56. Вып. 6. С. 525–534.