

ПРОАПОПТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ СУМАРНОГО ПРЕПАРАТУ ФІТОГЕМАГЛЮТИНІНУ ТА ЙОГО ОКРЕМИХ ІЗОЛЕКТИНІВ У КУЛЬТУРІ КЛІТИН ЛЮДИНИ 4BL

Т. О. КОЧУБЕЙ, О. В. МАКСИМЧУК, Л. Л. МАЦЕВИЧ,
О. О. ПІВЕНЬ, Л. Л. ЛУКАШ

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ;
e-mail: kochubei2009@ukr.net

Фітогемаглютинін (ФГА) – широко досліджуваний лектин, що має мітогенні властивості. За останніми експериментальними даними ФГА не лише індукує поділ клітин, а й має токсичну, або цитостатичну дію. Однак молекулярні механізми такого впливу залишаються недостатньо вивченими. Метою роботи було дослідити проапоптичні властивості сумарного препарату фітогемаглютиніну та його окремих ізолектинів у культурі клітин людини непухлинного походження 4BL. З використанням методу люмінесцентного забарвлення одержано дані, що вказували на ймовірну зміну частоти апоптичних клітин у досліджуваній культурі клітин за дії сумарного препарату фітогемаглютиніну та його окремого ізолектину – еритроаглютиніну. Із використанням методу Вестерн-блот аналізу було виявлено, що під впливом досліджуваних лектинів відбувається активація каспаз 3 та 8, а також індукція експресії проапоптозного протеїну Вах, при цьому найбільше підвищення вмісту активованих каспаз та протеїну Вах спричинює дія еритроаглютиніну. Порівняно з лейкоаглютиніном і сумарним препаратом фітогемаглютиніну еритроаглютинін найефективніше спричинює апоптоз, при цьому індукція апоптозу в культурі клітин людини непухлинного походження 4BL відбувається, ймовірно, як шляхом активації каспазозалежного, так і мітохондріального сигнальних шляхів.

Ключові слова: фітогемаглютинін та його ізолектини, апоптоз, активована каспаза-3, активована каспаза-8, протеїн Вах, культура клітин 4BL.

Відомо, що вуглевод-протеїнові взаємодії лежать в основі багатьох біологічних процесів, тому лектини широко використовують для вирішення різноманітних питань біології. Застосування лектинів на практиці стимулює також дослідження їхніх властивостей. У літературі описано модулюючий вплив цієї групи протеїнів на внутрішньоклітинні процеси, а саме: мутацію, репарацію, проліферацію та апоптоз [1, 2].

Одним із найдослідженіших лектинів є фітогемаглютинін (ФГА) квасолі звичайної *Phaseolus vulgaris*. Мітогенну активність ФГА відкрито ще на початку 60-х років ХХ сторіччя [3]. На сьогодні цей лектин широко застосовується під час проведення цитогенетичних досліджень. Також науковцями накопичено численні дані щодо інших властивостей цього лектину. Наприклад, показано, що ФГА пришвидшує ріст корінців *Allium cepa* та проростків *Rh. coccineus* на перших стадіях росту. З'ясовано, що ФГА є токсичним для ли-

чинок деяких жуків, які поїдають насіння злаків та бобових. Хоча вираженого токсичного впливу лектину квасолі на організм щурів не спостерігалось, однак було виявлено, що надмірне вживання сирих насінин призводить до затримки їх росту та зниження засвоєння азоту в клітинах слизової оболонки кишечника. Автори вважають, що лектин квасолі взаємодіє з глікокаліксом ентероцитів, спричиняючи пошкодження цих клітин. Також показано, що ФГА впливає на ліпідний катаболізм, знижує рівень інсуліну в плазмі крові [3] та сильно пригнічує секрецію соляної кислоти базальними клітинами шлунка щурів [4]. Із використанням культури клітин раку легенів людини було показано, що один з ізолектинів ФГА – еритроаглютинін, інгібує ріст клітин, спричинюючи апоптоз через активацію мітохондріального шляху [5].

Отже, все вищезгадане дає змогу оцінювати ФГА не лише як ефективний мітоген, але і як певний модулятор інших внутрішньоклітинних процесів. Очевидно, що цей лектин здатний

впливати на проліферацію клітин ссавців не лише стимулюючи, а й пригнічуючи її за певних умов.

Раніше нами було виявлено здатність деяких лектинів рослинного та тваринного походження дозозалежно впливати на проліферацію клітин ссавців та індукувати в них апоптоз [2]. Відомо, що більшість лектинів реалізують свою активність опосередковано, через взаємодію з вуглеводними детермінантами на поверхні клітинної мембрани [6]. Разом із цим іншими авторами показано, що деякі лектини виявляють лектинасоційовану ензиматичну активність, завдяки якій вони можуть безпосередньо взаємодіяти з макромолекулами у клітині та індукувати апоптоз [7]. Разом з цим, ще й досі залишаються маловивченими молекулярні механізми дії лектинів на апоптоз клітин ссавців.

Метою роботи було дослідити проапоптотичні властивості сумарного препарату фітогемаглютиніну та його окремих ізолектинів у культурі клітин людини 4BL і виявити можливі шляхи індукції апоптозу цими протеїнами.

Матеріали і методи

Досліджували вплив комерційних препаратів лектинів квасолі звичайної *Phaseolus vulgaris* – фітогемаглютиніну та його ізолектинів (Лектинотест, Львів) на апоптотні процеси у культурі клітин *in vitro*. Як тест-систему використовували лінію клітин людини 4BL із периферійної крові здорового донора. Клітинна лінія 4BL одержана у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології та генетики НАН України [8]. Клітини культивували у стандартному ростовому середовищі Ігла (MEM, Sigma, США), що містило 5% ембріональної сироватки великої рогатої худоби (Sigma, США) і антибіотики: пеніцилін і стрептоміцин (Arterium, Україна) по 100 од./мл кожного [9].

Клітини обробляли ФГА-Р (сумарний препарат фітогемаглютиніну), ФГА-Е (еритроаглютинін) і ФГА-Л (лейкоаглютинін) протягом 4 год та аналізували відразу після завершення обробки. Концентрація препаратів становила 1 мкг/мл. Контролем у досліді були клітини лінії 4BL, культивовані за тих самих умов, але не оброблені досліджуваними лектинами. У разі дослідження проапоптотної дії лектинів як позитивний контроль використовували культуру клітин, оброблену впродовж

1 год N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідіном (МННГ) із кінцевою концентрацією 5 мкг/мл.

Для попереднього визначення розподілу у культурі 4BL частот клітин: живих, мертвих та на ранній стадії апоптозу, застосовували скринінговий метод забарвлення специфічними барвниками – бромистим етидієм та акридино-вим оранжевим [10]. Препарати аналізували за допомогою методу люмінесцентної мікроскопії (ЛОМО, Росія) зі збільшенням $\times 90$.

Дослідження вмісту розщеплених форм каспази-3 та каспази-8, а також проапоптотного протеїну Вах у тотальних лізатах клітин за дії зазначених лектинів проводили методом Вестерн-блот аналізу із застосуванням специфічних антитіл згідно з рекомендацією фірми-виробника. Тотальний лізат клітин одержували з використанням RIPA-буфера за методом [11]. Концентрацію тотального протеїну в досліджуваних зразках вимірювали за методом Бредфорда із використанням реактиву Бредфорда (Sigma, США) згідно з інструкцією фірми-виробника. Сумарний протеїн розділяли за допомогою гелі-електрофорезу в 15%-му ПААГ у присутності 0,1%-го DSNa за методом Леммлі [12]. Для аналізу рівня розщеплених форм каспази -3, -8 та Вах були використані комерційні специфічні антитіла: anti-Cleaved caspase-3 p11 (H176)-R: sc-22171 (Santa Cruz Biotechnology, США), anti-Cleaved caspase-8 p18 (H134): sc-7890 (Santa Cruz Biotechnology, США), anti-Waх HPA027878 (Sigma, США) відповідно. Як внутрішній контроль методу використовували антитіла anti-GAPDH G8795 (Sigma, США). Проведено три повтори кожного експерименту. Візуалізацію та обрахунок результатів Вестерн-блотингу проводили за допомогою спеціального обладнання Molecular Imager Chemi Doc XRS+ Image Lab (Bio-Rad, США). Кількість досліджуваних протеїнів представлено у відносних одиницях, які рахували як відношення вмісту досліджуваних протеїнів до вмісту контрольного протеїну anti-GAPDH на тій самій доріжці гелю [11].

Для обробки результатів дослідження використовували пакет статистичних програм STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc. 2004, США), а для оцінки різниці показників – *t*-критерій Стьюдента. Значення $P \leq 0,05$ розглядали як критерій значущості різниці. Результати представлені у вигляді середніх значень для $n = 3$ із зазначенням стандартного відхилення (Mean \pm S.D).

Результати та обговорення

Раніше з використанням мікрокультурального тесту було досліджено вплив ФГА та його окремих ізолектинів на проліферацію злоякісних клітин ссавців та клітин непухлинного походження в умовах *in vitro*. Встановлено, що усі досліджувані лектини здатні залежно від концентрації та обраної тест-системи індукувати або, навпаки, інгібувати проліферацію клітин [13]. Цікавим виявилось те, що в культурі клітин непухлинного походження 4BL [8], на відміну від клітин раку гортані людини Her2, досліджувані лектини виявляли переважно мітогенну активність при низьких концентраціях, однак при високих концентраціях призводили до зменшення кількості клітин [13]. Отже, як власні дані [13], так і дані літератури [5] дозволяють припустити, що фітогемаглютинін та його ізолектини здатні не лише до мітогенної дії, але й можуть виявляти проапоптозну дію за певних умов.

Під час дослідження впливу лектинів на культуру клітин людини 4BL показано, що дія сумарного препарату ФГА та еритроаглютиніну призводила до змін розподілу частот живих, мертвих та апоптозних клітин у культурі (рис. 1, А, Б, В): значно зростала порівняно із контролем кількість мертвих клітин та клітин, що знаходились на ранній стадії апоптозу (рис. 1, Г). При цьому найефективніша індукція апоптозу спостерігалась під впливом еритроаглютиніну. У той же час, обробка культури іншим ізолектином ФГА – лейкоаглютиніном, істотно не впливала на частоту апоптозу, але вірогідно збільшувала порівняно з контролем кількість мертвих клітин за умов експерименту. Разом з цим, МННГ виявився ефективнішим індуктором процесів апоптозу в культурі клітин 4BL порівняно з сумарним препаратом ФГА та лейкоаглютиніном (рис. 1, Г).

На наступному етапі роботи вивчали які саме молекулярні шляхи залучаються до реалізації апоптозних властивостей досліджуваних лектинів. Як позитивний контроль використовували МННГ, що є активним індуктором апоптозу, дія якого опосередкована через каспазонезалежний механізм із залученням АІФ-протеїну [14].

За допомогою Вестерн-блот аналізу виявлено, що в контрольних препаратах незначний вміст активованих каспаз, очевидно, пов'язаний з наявністю в культурі мінорної фракції апоп-

тозних клітин, що, зрештою, узгоджується з даними люмінесцентної мікроскопії. Присутність такої фракції в інтактних клітинних культурах підтверджується також даними літератури [16]. Обробка еритроаглютиніном клітин 4BL призводить до значного підвищення порівняно з контролем вмісту розщеплених форм каспази-3 (\approx у 10 разів) та каспази-8 (\approx у 5 разів) (рис. 2, А, Б, В). Одночасно з цим, вміст цих розщеплених фрагментів каспаз більш ніж у 2 рази перевищує такі показники, одержані в клітинах після обробки ФГА-L (рис. 2, А, Б, В).

Такі дані узгоджуються з результатами, одержаними під час цитологічних досліджень впливу лектинів ФГА на частоту апоптозних клітин у культурі 4BL (рис. 1). Зауважимо, що в умовах експерименту, саме дія еритроаглютиніну призводила до значного підвищення (порівняно з контролем) відсотку апоптозних та мертвих клітин у культурі (рис. 1).

Сумарний препарат ФГА та лейкоаглютинін спричиняли підвищення вмісту розщеплених форм каспази-3 та -8 більш ніж у 3 рази порівняно з контролем, але їхні рівні були значно нижчі порівняно з дією еритроаглютиніну (рис. 2, А, Б, В).

Під час дослідження можливої індукції мітохондріального шляху апоптозу за дії лектинів вивчали рівень експресії протеїну Вах в клітинах культури 4BL. Виявлено, що всі досліджувані лектини підвищують рівень цього показника (рис. 2, А, Г). Найвищий вміст протеїну Вах (приблизно у 4 рази порівняно з контролем) спостерігався після обробки клітин еритроаглютиніном. Це може свідчити про більш виражений проапоптозний ефект цього ізолектину порівняно з ФГА-Р і ФГА-L. Найменшу індукуючу дію серед лектинів проявляв ФГА-L, але при цьому рівень експресії протеїну Вах у клітинах, був значно вищим (приблизно у 2 рази) порівняно з контролем (рис. 2, А, Г).

Отже, показано, що сумарний препарат ФГА та його ізолектини здатні індукувати апоптоз у культурі клітин ссавців непухлинного походження. Виявлено, що досліджувані лектини здатні активувати ланку каспазного каскаду (ініціаторну каспазу-8 та ефекторну каспазу-3), а також призводити до підвищення рівня проапоптозного протеїну Вах, що може свідчити про індукцію мітохондріального шляху апоптозу. При цьому в трьох досліджених лектинів еритроаглютинін найбільше підвищував

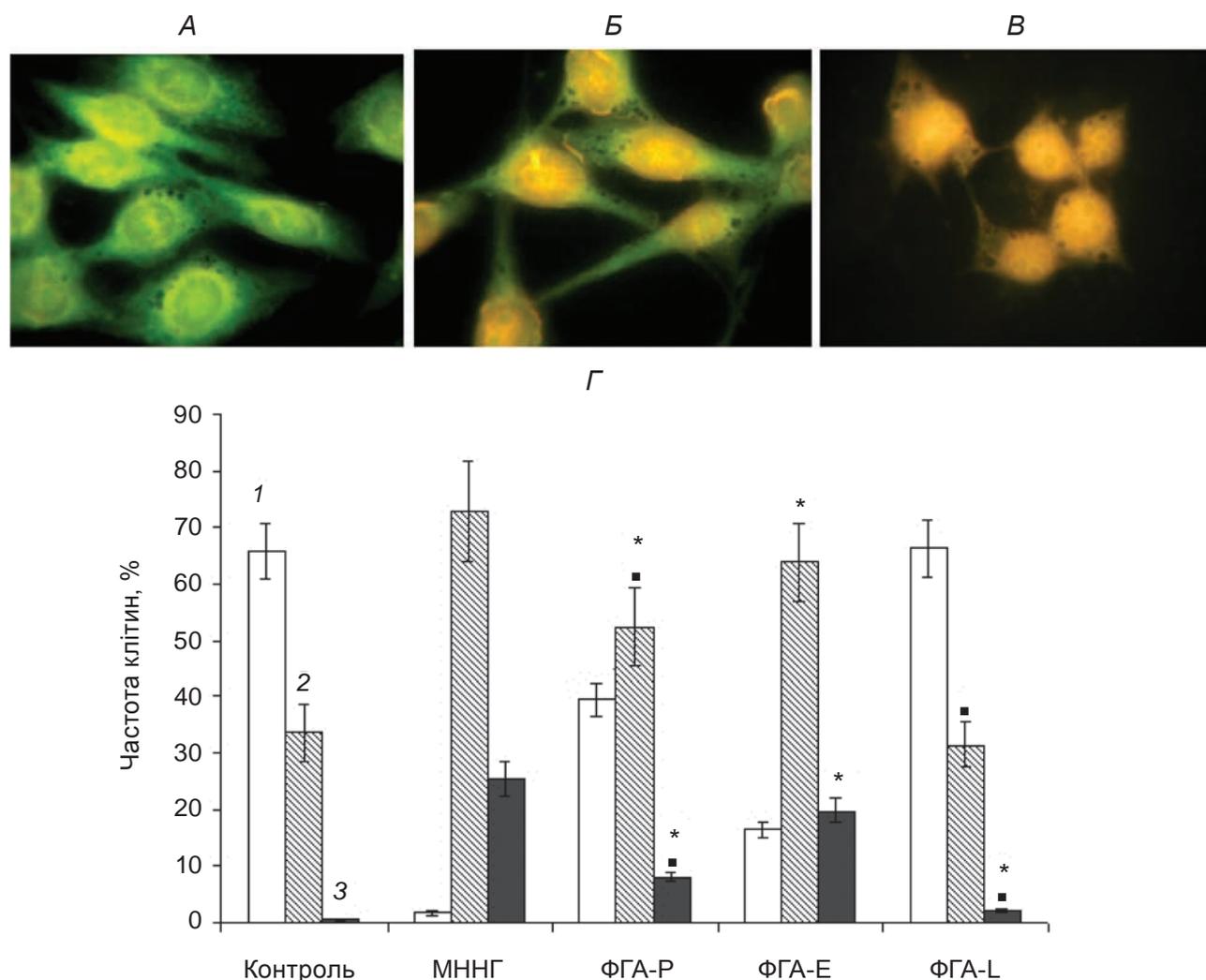


Рис. 1. Індукція апоптозу в культурі клітин 4BL сумарним препаратом ФГА та його ізолектинами. Мікрофотографії клітин 4BL після обробки специфічними барвниками – бромистим етидієм (ЕБ) та акридиновим оранжевим (АО) (збільшення $\times 90$): А – живі клітини (хроматин з організованою структурою яскраво-зеленого кольору), Б – клітини на стадії раннього апоптозу (цитоплазма зеленого забарвлення та сильно конденсований або фрагментований хроматин яскраво-жовтого кольору), В – мертві клітини (хроматин яскраво-жовтого або помаранчевого кольору). Г – Розподіл частот клітин у культурі 4BL: 1 – живі клітини, 2 – клітини на стадії раннього апоптозу, 3 – мертві клітини. * $P \leq 0,05$ та $\blacksquare P \leq 0,05$ порівняно з контролем та дією МННГ відповідно

відсоток апоптозних клітин у культурі клітин та кількість розщеплених форм ініціаторної та ефекторної каспаз. Ці дані дозволяють зробити припущення щодо індукції апоптозу в культурі клітин людини непухлинного походження сумарним препаратом ФГА та його ізолектинами через активацію каспазозалежного та мітохондріального шляхів. Варто зауважити, що здатність еритроаглютиніну індукувати апоптоз у культурі клітин раку легень людини було також показано і в дослідженнях інших

авторів, де встановлено, що індукція проапоптозних процесів відбувається внаслідок активації мітохондріального сигнального механізму [5]. Отже, можна припустити, що залежно від стану клітин, а саме від відмінностей патернів вуглеводних груп та рецепторів на поверхні мембрани [15], еритроаглютинін виявляє здатність індукувати апоптоз як ракових клітин, так і клітин непухлинного походження, можливо, активуючи різні сигнальні механізми.

аналогічних досліджень, але з використанням пухлинних культур клітин лейкоаглютинін також буде демонструвати проапоптичну дію, але це лише припущення, яке потребує подальшого вивчення.

Вираженіший індукуючий вплив ФГА–Е на рівень розщепленої форми каспази-3 порівняно з іншими досліджуваними протеїнами можливо пояснюється тим, що цей ізолектин на відміну від лейкоаглютиніну, має вуглеводну специфічність до глікопротеїнів, які, як відомо, є структурними компонентами багатьох рецепторів на поверхні клітини. Можливо, завдяки своїй вуглеводній специфічності, еритроаглютинін здатен зв'язуватись і, таким чином, активувати більшу кількість рецепторів смерті, таких як TNF та FAS, але ці припущення потребують подальшої перевірки.

Таким чином, у роботі було показано, що фітогемаглютинін та його ізолектини здатні індукувати апоптоз у культурі клітин людини непухлинного походження 4BL із різною ефективністю, при цьому індукція апоптозу відбувається, ймовірно, як шляхом активації каспазозалежного, так і мітохондріального сигнальних шляхів.

ПРОАПОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СУММАРНОГО ПРЕПАРАТА ФИТОГЕМАГГЛЮТИНИНА И ЕГО ОТДЕЛЬНЫХ ИЗОЛЕКТИНОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА 4BL

*Т. А. Кочубей, О. В. Максимчук,
Л. Л. Мацевич, О. А. Пивень, Л. Л. Лукаш*

Институт молекулярной биологии
и генетики НАН Украины, Киев;
e-mail: kochubei2009@ukr.net

Фитогемаглютинин (ФГА) – известный лектин, обладающий митогенными свойствами. По последним экспериментальным данным, ФГА не только индуцирует деление клеток, но и обладает токсическим или цитостатическим действием. Однако молекулярные механизмы такого влияния остаются недостаточно изученными. Целью работы было исследовать проапоптотические свойства суммарного препарата фитогемаглютинина и его отдельных изолектинов в культуре клеток человека неопухолевого происхождения 4BL. Используя метод специфической окраски люминесцентными красителями

получены данные, указывающие на возможную смену частоты апоптотических клеток в исследуемой культуре клеток под действием суммарного препарата фитогемаглютинина и его отдельного изолектина – эритроаглютинина. С использованием метода Вестерн-блот анализа выявлено, что под влиянием исследуемых лектинов происходит активация каспазы-3 и -8, а также индукция экспрессии проапоптотического протеина Bax, при этом наибольшее увеличение содержания активированных каспаз и протеина Bax вызывает действие эритроаглютинина. Эритроаглютинин по сравнению с лейкоаглютинином и суммарным препаратом фитогемаглютинина вызывает апоптоз с наибольшей эффективностью, при этом индукция апоптоза в культуре клеток человека неопухолевого происхождения 4BL происходит, вероятно, как путем активации каспазозависимого, так и митохондриального сигнальных путей.

Ключевые слова: фитогемаглютинин и его изолектины, апоптоз, активированная каспаза-3, активированная каспаза-8, протеин Bax, культура клеток 4BL.

PROAPOPTOTIC PROPERTIES OF TOTAL PHYTOHEMAGGLUTININE AND ITS INDIVIDUAL ISOLECTINS IN HUMAN CELL CULTURE 4BL

*T. O. Kochubei, O. V. Maksymchuk,
L. L. Macewicz, O. O. Piven, L. L. Lukash*

Institute of Molecular Biology and Genetics,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: kochubei2009@ukr.net

Phytohemagglutinine (PHA) is widely investigated lectin with mitogenic properties. Recently it was shown that PHA is not only cell proliferation inducer, but also has a toxic or cytostatic effect. However concentration dependence and molecular mechanisms of this effect are not enough investigated. To study proapoptotic properties of total phytohemagglutinine and its isolectins in human cell culture of not tumor origin 4BL we observed a change in the frequency of apoptotic cells in the tested cell culture under the influence of the total phytohemagglutinine and erythroagglutinin by the method of specific color luminescent dye. The activation of caspases-3 and -8 and induction of protein Bax expression under the influence of lectins were detected by Western blot analysis. It was revealed

that erythroagglutinin induced apoptosis with the highest efficiency compared with leukoagglutinin and total phytohemagglutinine. The induction of apoptosis in human cell culture of not tumor origin 4BL is probably caused by activating caspase-dependent and mitochondrial signalling.

Key words: Phytohemagglutinine and its isolectins, apoptosis, active caspase-3, active caspase-8, protein Bax, cell culture 4BL.

References

1. Piven' O. A., Lukash L. L. Influence of exogenous proteins on mutagenic process // *Tsitol. Genet.* – 2011. – **45**, N 1. – P. 68–79. (In Russian).
2. Kovalenko O. O., Lukash L. L. Effect of lectins on induction of apoptosis in the populations of mammalian cells *in vitro* // *Tsitol. Genet.* – 2007. – **41**, N 5. – P. 48–53. (In Ukrainian)
3. Antonyuk V. O. Lectins and theirs sources of raw materials. – Lviv: Kwart, 2005. – 554 p. (In Ukrainian).
4. Baintner K., Kiss P., Bardocz S., Pusztai A. Effect of orally administered plant lectins on intestinal liquor accumulation and amylase activity in rats // *Acta Physiol. Hung.* – 2004. – **91**, N 1. – P. 73–81.
5. Kuo W. T., Ho Y. J., Kuo S. M., Lin F. H., Tsai F. J., Chen Y. S., Dong G. C., Yao C. H. Induction of the mitochondria apoptosis pathway by phytohemagglutinin erythroagglutinating in human lung cancer cells // *Ann. Surg. Oncol.* – 2011. – **18**, N 3. – P. 848–856.
6. Lis H., Sharon N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition // *Chem. Revs.* – 1998. – **98**, N 2. – P. 637–674.
7. Peumans W., Hao Q., Van Damm E. J. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? // *FASEB J.* – 2001. – **15**, N 9. – P. 1493–1506.
8. Lukash L. L., Yatsyshyna A. P., Kushnyruk V. A., Pydpala O. V. Changing of adult somatic cells *in vitro* // Proceedings of the International Conference “Factors Experimental evolution of organisms” / Alushta, September 2011. – K.: Logos, 2011. – P. 493–498.
9. Lukash L. L., Paton E. B., Sukhorada E. M., Ruban T. A., Krupskaya I. S., Kostetskaia E. V., Bratsiuk S. I. The evaluation of the cytotoxicity of preparations with anticarcinogenic effect in cultures of human cell // *Tsitol. Genet.* – 1997. – **31**, N 6. – P. 26–34. (In Russian).
10. McGanon A. J., Martin S. J., Bissonnette R. P., Mahboubi A., Shi Y., Mogil R. J., Nishioka W. K., Green D. R. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis *in vitro*. In book *Methods in cell biology*. Schwartz L. M., Osborne B. A., editors. – Acad. Pres Inc “Cell Death”, 1995. – P. 172–173.
11. Maksymchuk O. V., Bezdrobna L. K., Sidorik L. L., Kiseleva O. K., Chaschyn M. O. Cytochrome P450 2E1 expression in mice liver under exposure of continuous and acute γ -radiation // *Ukr. Biochem. J.* – 2008. – **80**, N 4. – P. 59–65. (In Ukrainian).
12. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – **227**, N 5259. – P. 680–685.
13. Kochubei T. O., Piven O. O., Andrienko V. I., Macewicz L. L., Karpova I. S., Lukash L. L. Influence of Phaseolus vulgaris phytohemagglutinin and its isoforms on the proliferation and survival of mammalian cells *in vitro* // *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine.* – 2012. – **10**, N 1. – P. 42–50. (In Ukrainian).
14. Wang D., Liang J., Zhang Y., Gui B., Wang F., Yi X., Sun L., Yao Z., Shang Y. Steroid receptor coactivator-interacting protein (SIP) inhibits caspase-independent apoptosis by preventing apoptosis-inducing factor (AIF) from being released from mitochondria // *J. Biol. Chem.* – 2012. – **287**, N 16. – P. 12612–12621.
15. Lima L. R., Bezerra M. F., Almeida S. M., Silva L. P., Beltrão E. I., Carvalho Júnior L. B. Glycophenotype evaluation in cutaneous tumors using lectins labeled with acridinium ester // *Dis. Markers.* – 2013. – **35**, N 3. – P. 149–154.
16. Eriksson D., Löfroth P. O., Johansson L., Riklund K., Stigbrand T. Apoptotic signalling in HeLa Hep2 cells following 5 Gy of cobalt-60 gamma radiation. // *Anticancer Res.* – 2009. – **29**, N 11. – P. 4361–4366.
17. Yamamoto H., Swoger J., Greene S., Saito T., Hurh J., Sweeley C., Leestma J., Mkrdichian E., Cerullo L., Nishikawa A., Ihara Y., Taniguchi N., Moskal J. R. Beta1,6-N-acetylglucosamine-bearing N-glycans in human gliomas: implications for a role in regulating invasivity // *Cancer Res.* – 2000. – **60**, N 1. – P. 134–142.

Отримано 19.12.2013