

В.И. КОВАЛЕВА, Н.В. БАГАЦКАЯ

ГУ «Институт охраны здоровья детей и подростков
АМН Украины», Харьков
E-mail: iozdp@ukrpost.ua

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДЕТЕЙ УЧАСТНИКОВ ЛИКВИДАЦИИ ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АВАРИИ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ МИТОМИЦИНА С *IN VITRO* И ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ *IN VIVO*



Представлены результаты цитогенетического обследования детей, отцы которых принимали участие в ликвидации аварии на ЧАЭС. Установлено, что спонтанный уровень aberrаций хромосом до приема детьми фолиевой кислоты в 1,8 раза превышал аналогичный показатель после применения препарата (4,45 % по сравнению с 2,42 %, $p < 0,01$), в культурах лимфоцитов, обработанных митомицином С после приема фолиевой кислоты, — в 4,5 раза (23,95 % по сравнению с 5,36 %, $p < 0,001$). Полученные результаты подтвердили возможность повышения стабильности генетического аппарата детей участников ликвидации Чернобыльской аварии при использовании фолиевой кислоты.

© В.И. КОВАЛЕВА, Н.В. БАГАЦКАЯ, 2013

Введение. Оценка генетических последствий аварии на Чернобыльской АЭС до настоящего времени продолжает оставаться чрезвычайно актуальной и вызывает пристальный интерес научной общественности во всем мире. Одной из наиболее важных является проблема передачи через облученные половые клетки отцов состояния нестабильности генома первому поколению их потомков [1, 2]. В работе Кузьминой и др. [3] показано, что ионизирующая радиация приводит к геномной нестабильности в виде различных нарушений генетического аппарата (разрывы ДНК, структурные aberrации хромосом, генные мутации, сестринские хроматидные обмены), анеуплоидий, полиплоидий. Получены также данные, в которых установлено, что часть клеток, выживших после облучения, может давать функционально измененное потомство, у которого с высокой частотой на протяжении многих поколений возникают *de novo* aberrации хромосом и генные мутации. Эти отдаленные проявления радиационного эффекта не имеют клонального характера и получили название радиационно-индуцированной нестабильности генома [4]. Геномная нестабильность в половых клетках, индуцированных сублетальными дозами ионизирующей радиации у отцов, может возникнуть в соматических клетках потомков, которые не подвергались облучению, но сигналы пораженности получили от облученных лиц [5].

Генетические последствия облучения приводят не только к серьезным нарушениям в развитии потомства, но также к увеличению канцерогенного риска, геномной нестабильности и ухудшению жизнеспособности фенотипически нормального потомства облученных отцов [6]. Такие закономерности реагирования на облучение, как «адаптивный отклик», индукция генетической нестабильности, эффект свидетеля, апоптоз и ответ на псевдоцитокиновое влияние радиации получены многими авторами [7, 8].

Проведенные нами ранее исследования [9, 10] с использованием блеомицина в качестве мутагена-провокатора показали, что у детей, рожденных от участников ликвидации последствий аварии (УЛПА), установлено существенное увеличение уровня хромосомных нарушений, числа полиплоидных кле-

ток. Это поставило перед нами задачу по стабилизации генома таких больных, что является обязательным условием полноценного развития организма, а его дестабилизация ассоциируется с формированием патологического фенотипа, высоким риском апоптотической гибели клеток или их переходом на путь онкогенной трансформации [11].

Важность упомянутой проблемы в связи с Чернобыльской аварией обусловлена необходимостью защиты генетического аппарата пострадавших лиц в условиях глобального загрязнения окружающей среды разными агентами физической и химической природы, что привело к увеличению темпов мутационного процесса и генетического груза у потомков (спонтанные аборт, мертворождения, детская смертность, врожденные пороки развития) [12, 13]. Снижение генотоксических эффектов осуществляется благодаря развитой в процессе эволюции системе природной клеточной защиты [14]. Целостность и стабильность наследственных структур поддерживается матричными процессами, среди которых большое значение имеет репарация ДНК. Уровень пораженности генома зависит от способности репарировать постоянно возникающие в результате внешних влияний повреждения. При дефектах в этой системе уровень повреждений будет повышен. Снижение же активности защитных и компенсаторно-восстановительных систем организма может способствовать усилению процессов мутагенеза, увеличению хромосомных aberrаций и формированию геномной нестабильности, что может привести к физиологической и функциональной неполноценности разных органов и систем [15].

Особое внимание привлекают антимуtagenные и противотератогенные свойства ряда лекарственных препаратов, в частности фолиевой кислоты (ФК). Хорошо известно, что ФК принимает участие в синтезе пуринов и пиримидинов, основных структурных элементов ДНК, а также выполняет защитную функцию относительно влияния тератогенных факторов. Поэтому повышение устойчивости генетического аппарата детей, рожденных в семьях УЛПА, к действию неблагоприятных факторов окружающей сре-

ды, количество которых из года в год увеличивается, заслуживает на сегодняшний день особого внимания.

Таким образом, социальная реабилитация детей, рожденных в семьях УЛПА, должна включать мероприятия по повышению устойчивости генетического аппарата к действию негативных факторов окружающей среды. Очевидно, что негативное влияние средовых генотоксикантов на организм человека испытывают все звенья механизма передачи наследственной информации, а срыв возможен на любом из этих этапов. В силу указанных причин компенсационный подход, направленный на повышение устойчивости генетического аппарата к действию повреждающих факторов, в том числе и с использованием антимуtagenов, представляется на современном этапе наиболее эффективным [16]. Все это и определило цель настоящего исследования – изучить спонтанный и индуцированный мутагенез, а также влияние ФК на стабильность хромосомного аппарата детей, отцы которых принимали участие в ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС.

Материалы и методы. Углубленное клинико-инструментальное обследование детей УЛПА свидетельствовало о высокой частоте у них различных хронических неинфекционных заболеваний (астено-невротический синдром, вегето-сосудистая дисфункция, хронический гастродуоденит, дискинезия желчевыводящих путей).

Проведено цитогенетическое обследование 15 детей, рожденных в семьях УЛПА, по стандартному методу [17]. Среди обследованных лиц было 8 девочек и 7 мальчиков в возрасте от 10 до 17 лет.

Материалом для цитогенетического анализа служили препараты хромосом, полученные из культуры лимфоцитов периферической крови (ЛПК). Для оценки влияния мутагена на стабильность хромосомного аппарата у детей через 67 ч от начала инкубации в культуру вносили митомицин С в конечной концентрации 3 мкг/мл. За 3 ч до фиксации в культуру клеток добавляли колхицин в конечной концентрации 7,5 мкг/мл. Культивирование лимфоцитов периферической

крови для оценки стабильности генома, как правило, проводится в течение 48 ч, однако митомицин С, являясь противоопухолевым антибиотиком, обладает сильным цитотоксическим эффектом, и первые митозы после воздействия этим мутагеном могут появляться только на 72-м часу культивирования лимфоцитов. Цитогенетическое обследование пациентов осуществляли двукратно:

1) до приема ФК (спонтанный мутагенез – первая группа) и с дополнительной обработкой полученных культур мутагеном-провокатором митомицином С *in vitro* (индуцированный мутагенез – вторая группа);

2) после приема ФК детьми *per os* по схеме 0,001 г три раза в сутки на протяжении 15 дней с оценкой спонтанного мутагенеза (третья группа) и мутагенеза, индуцированного митомицином С (четвертая группа).

От каждого ребенка анализировали от 80 до 100 метафаз без тестирующего влияния и с дополнительной мутагенной обработкой культур *in vitro*. Всего у детей, рожденных в семьях УЛПА, проанализировано 5082 метафазные пластинки: 1259 метафаз до мутагенной нагрузки митомицином С и 973 – после воздействия мутагеном; 1488 метафаз после приема ФК без воздействия мутагена и

1362 – под влиянием мутагена и приема ФК. Учитывали все структурные aberrации хроматидного и хромосомного типа, а также численные aberrации (полиплоидные клетки). Анализ метафазных пластинок проводили с помощью бинокулярного микроскопа фирмы «Leica Galen III» (Австрия), окуляр 15×, объектив 100×, бинокулярная насадка 1,25×. Статистические расчеты выполнены с использованием t-критерия Стьюдента [18] в прикладном пакете программ Excel, «SPSS Statistics 17,0».

Результаты исследований и их обсуждение. Цитогенетический анализ, проведенный в группах детей УЛПА, показал, что их кариотип соответствовал нормальному женскому – 46,XX или мужскому – 46,XY. Спонтанный уровень aberrаций хромосом в лимфоцитах, не обработанных митомицином С, до и после приема ФК (в первой и второй группах) составил 4,45 и 2,42 % соответственно, что показало статистически значимое снижение уровня aberrаций хромосом после приема препарата, $p < 0,01$.

Частота aberrаций хроматидного и хромосомного типа у детей первой группы не различалась, в то время как во второй группе преобладали aberrации хроматидного типа

Таблица 1
Сравнение спонтанной и индуцированной митомицином С частоты aberrаций хромосом у детей ликвидаторов аварии на ЧАЭС до приема фолиевой кислоты ($\% \pm m; n = 15$)

Аберрации хромосом	Первая группа, до мутагенной нагрузки, $n = 1259$	Вторая группа, после мутагенной нагрузки, $n = 973$
Хроматидного типа	$0,79 \pm 0,25$ ***	$15,42 \pm 1,16$ ***
одиночные фрагменты	$0,79 \pm 0,25$ ***	$15,42 \pm 1,16$ ***
Хромосомного типа	$0,64 \pm 0,22$ ***	$7,29 \pm 0,83$ ***
парные фрагменты	$0,55 \pm 0,21$ ***	$6,37 \pm 0,78$ ***
преждевременное расхождение центромер	$0,56 \pm 0,21$	$0,31 \pm 0,18$
разрывы по центромере	–	$0,41 \pm 0,21$ *
дисцентрические хромосомы	–	$0,21 \pm 0,16$
клетки с явлением эндоредупликации	–	$0,11 \pm 0,11$
Всего aberrаций	$1,43 \pm 0,33$ ***	$22,71 \pm 1,34$ ***
Полиплоидные клетки	$2,38 \pm 0,43$ ***	$0,71 \pm 0,27$ ***
Тотальное повреждение хромосом	$0,08 \pm 0,08$	$0,41 \pm 0,21$
Сумма всех повреждений хромосом	$4,45 \pm 0,58$ ***	$23,95 \pm 1,37$ ***

Примечание. Статистически значимые различия между детьми первой и второй групп: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

(табл. 1). Следует отметить, что уровень aberrаций хроматидного типа после дополнительной мутагенной нагрузки возрос с 0,79 до 15,42 %, а частота aberrаций хромосомного типа, индуцированных митомицином С, с 0,64 до 7,29 %.

Среди aberrаций хроматидного типа преобладали одиночные фрагменты, среди aberrаций хромосомного типа – парные фрагменты и разрывы по центромере. Частота полиплоидных клеток до воздействия мутагеном-провокатором составила 2,38 после нагрузки митомицином С – 0,71 %, что можно объяснить неспецифической адаптивной реакцией клеток на мутагенную нагрузку. В некоторых исследованиях [19] по изучению частоты ХА в культуре ЛПК, полученных от больных с глиомами головного мозга, также были выявлены полиплоидные клетки, причем их количество увеличивалось с ростом степени злокачественности, что может являться одной из защитных функций организма против опухолей. Выявленный тип нарушений хромосомного аппарата, по данным некоторых авторов [20–22], очень редко встречается в популяциях, не отягощенных действием мутагенных факторов, что свидетельствует о нарушении процессов клеточного деления в результате нерасхождения хромосом при блокаде веретена деления или межклеточном слиянии. Общий уровень на-

рушений хроматидного и хромосомного типа составил 1,43 и 22,71 % ($p < 0,001$), что указывает на выраженный мутагенный эффект митомицина С на лимфоциты периферической крови детей, чьи отцы принимали участие в ликвидации последствий аварии на ЧАЭС.

Изучение влияния ФК на мутагенный эффект митомицина С показало, что уровень aberrантных клеток под влиянием ФК в ответ на действие мутагена-провокатора снизился с 15,42 до 3,96 %, $p < 0,001$ (табл. 2). Известно, что антимуагены, к которым относится ФК, могут стабилизировать структуру ДНК, усиливать или ослаблять интенсивность процессов ошибочной и безошибочной репарации, ингибировать свободно-радикальные процессы, репрессировать гены, активирующие защитные системы клеток, и выполнять другие функции в клетке [23]. У обследованных нами детей обнаружены также клетки с тотальным повреждением хромосом. До приема ФК их частота в интактных культурах и культурах, обработанных мутагеном-провокатором, составила 0,08 и 0,41 % ($p < 0,001$), в то же время после приема ФК клеток с тотальным повреждением хромосом зарегистрировано не было.

При сопоставлении реакции хромосомного аппарата лимфоцитов периферической крови на тестирующее мутагенное влияние *in vitro* после приема ФК установлено снижение

Таблица 2
Сравнение частоты aberrаций хромосом у детей участников ликвидации последствий Чернобыльской аварии до и после мутагенной нагрузки митомицином С после приема ФК (% $\pm m$; $n = 15$)

Аберрации хромосом	Третья группа, до нагрузки митомицином С, после приема ФК, $n = 1488$	Четвертая группа, после нагрузки митомицином С, после приема ФК, $n = 1362$
Хроматидного типа	1,48 \pm 0,31 ***	3,96 \pm 0,53 ***
одиночные фрагменты	1,48 \pm 0,31 ***	3,96 \pm 0,53 ***
Хромосомного типа	1,48 \pm 0,31	0,95 \pm 0,26
парные фрагменты	0,60 \pm 0,20	0,95 \pm 0,36
Всего aberrаций хромосомного и хроматидного типа	2,08 \pm 0,37 ***	4,92 \pm 0,59 ***
Полиплоидные клетки	0,34 \pm 0,15	0,44 \pm 0,18
Сумма всех повреждений хромосом	2,42 \pm 0,39 ***	5,36 \pm 0,61 ***

Примечание. Статистически значимые различия между детьми третьей и четвертой групп: *** $p < 0,001$.

как общего уровня aberrаций хромосом с 23,95 до 5,36 % ($p < 0,001$), так и отдельных типов хромосомных aberrаций. Так, частота aberrаций хроматидного типа в культурах, обработанных митомицином С после приема ФК, составила $3,96 \pm 0,53$ % по сравнению с $1,49 \pm 0,31$ % ($p < 0,001$), в то время как частота aberrаций хромосомного типа, индуцированных митомицином С, и число полиплоидных клеток при действии мутагена-провокатора не различались в группах сравнения. По данным литературы [24], наличие повреждений в ферментативной системе репарации, вероятно, может проявляться высокой чувствительностью генетического аппарата к различным мутагенам, в частности к блеомицину. Повышенная чувствительность хромосом лимфоцитов к мутагенной нагрузке *in vitro* расценивается в настоящее время как предрасположенность к развитию онкопатологии [25–28].

Безусловная опасность генетической нестабильности соматических клеток для организма человека обуславливает необходимость продолжения цитогенетического мониторинга детей, рожденных в семьях УЛПА, для своевременного выявления лиц повышенного риска по развитию отдаленных соматостохастических эффектов с генетической компонентой. Полученные данные подтвердили возможность повышения устойчивости генетического аппарата детей, рожденных в семьях УЛПА, под влиянием ФК.

V.I. Kovaleva, N.V. Bagatskaya

CYTOGENETIC EFFECTS IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN THE OFFSPRING OF CHERNOBYL NUCLEAR POWER PLANT ACCIDENT LIQUIDATORS UNDER THE INFLUENCE OF MITOMYCIN C *IN VITRO* AND FOLIC ACID *IN VIVO*

The data on cytogenetic examination concerning the offspring of the Chernobyl accident liquidators (cleanup personnel) have been obtained. It has been established that spontaneous chromosomal aberrations level before folic acid administration was 1,8 times higher than that value after its employment (4,45 to 2,42 %, $p < 0,01$). In lymphocyte cultures treated with mitomycin C accompanied by folic acid it was 4,5 times higher before their administration (23,95 to 5,36 %, $p < 0,001$). The data obtained confirm a pos-

sibility of stabilization of genetic apparatus in offspring of the Chernobyl disaster liquidators after folic acid administration.

V.I. Kovaleva, N.V. Bagatskaya

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ЕФЕКТИ У ЛІМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ДІТЕЙ ЛІКВІДАТОРІВ ЧОРНОБИЛЬСЬКОЇ АВАРІЇ ПІД ВПЛИВОМ МІТОМІЦИНУ С *IN VITRO* ТА ФОЛІЄВОЇ КИСЛОТИ *IN VIVO*

Наведено результати цитогенетичного обстеження дітей, батьки яких брали участь у ліквідації аварії на ЧАЕС. Встановлено, що спонтанний рівень aberrаций хромосом до застосування фолієвої кислоти в 1,8 рази перевищував рівень після застосування препарату (4,45 % порівняно з 2,42 %, $p < 0,01$), у культурах лимфоцитів, оброблених митомицином С із застосуванням фолієвої кислоти, – у 4,5 рази (23,95 % порівняно з 5,36 %, $p < 0,001$). Отримані результати підтвердили можливість підвищення стабільності генетичного апарату дітей ліквідаторів аварії на ЧАЕС із застосуванням фолієвої кислоти.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Пілінська М.А. Цитогенетичні наслідки у чорнобильських контингентів пріоритетного спостереження // Медичні наслідки аварії на Чорнобильській атомній електростанції. – К., 2007. – С. 156–169.
2. Wright E.G. Radiation-induced genomic instability manifestation and mechanisms // Eur. Radiat. Res. 2006 : Abstr. of the 25th Ann. Meet. Eur. Radiat. Res. Soc. – К.: Чорнобильінтерінформ, 2006. – Р. 22.
3. Кузьмина Н.С., Сусков И.И., Садовников В.П., Сорочинский М.В. Безопасность жизнедеятельности // Экол. системы и приборы. – 2003. – № 7. – С. 41–46.
4. Заичкина С.И., Розанова О.М., Ахмадиева А.Х. и др. Выявление с помощью теста «адаптивный ответ» нестабильности генома у потомства самцов мышей, подвергнутых хроническому воздействию γ -излучений // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2002. – 42, № 6. – С. 608–611.
5. Воробцова Е.И. Генетические и соматические эффекты ионизирующей радиации у человека и животных // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2002. – 42, № 6. – С. 639–643.
6. Patak S., Multani A.S., Narayan S. et al. Germline telomere length dynamics and mutagen sensitivity studies in a family with acute reaction to sun exposure: involvement of three generations // J. Investigat. Dermatol. – 2007. – 127. – Р. 196–205.

7. *Wu X., Lippman S., Lee J. et al.* Chromosome instability in lymphocytes. A potential indicator of predisposition to oral premalignant lesions // *Cancer Res.* – 2002. – **62**. – P. 2813–2818.
8. *Пелевина И.И., Алещенко А.В., Антошина М.М. и др.* Уровень спонтанных и индуцированных облучением цитогенетических повреждений в лимфоцитах крови детей в зависимости от возраста и условий жизни // *Радиационная биология. Радиэкология.* – 2001. – **41**, № 5. – С. 573–580.
9. *Корнев Н.М., Ковалева В.И., Багацкая Н.В.* Клинико-генеалогические и цитогенетические особенности у детей, рожденных от отцов ликвидаторов аварии на ЧАЭС // *Международный журнал радиационной медицины.* – 2004. – **6**, № 1. – С. 82–87.
10. *Ковалева В.И., Багацкая Н.В., Деменкова И.Г., Нефедова В.Е.* Оценка мутагенеза у детей, рожденных в семьях ликвидаторов аварии на ЧАЭС // *Факторы экспериментальной эволюции организмов* : 36. науч. пр. – 2008. – **4**. – С. 401–405.
11. *Акопян Г.Р.* Передчасне розподілення хромосом як інформативний маркер хромосомної нестабільності в клітинах людини // *Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології* : 36. наук. пр. – Київ, 2007. – С. 390–393.
12. *Даливеля О.В., Савина Н.В., Кужир Т.Д., Гончарова Р.И.* Модуляция процессов репарации ДНК на примере действия производных 4-дигидроизоникотиновой кислоты // *Цитология и генетика.* – 2005. – **39**, № 5. – С. 62–72.
13. *Федота А.М., Козлова А.Н.* Исследование уровня генетической безопасности городского населения // *Цитология и генетика.* – 2005. – **39**, № 4. – С. 41–44.
14. *Гончарова Р.И.* Антимутагенез как генетический процесс // *Вестн. РАМН.* – 1993. – № 1. – С. 26–33.
15. *Балева Л.С., Сипягина А.Е., Лаврентьева Е.Б., Яковлева И.Н.* Определение групп риска возникновения радиационно-индуцированной соматической патологии у детей, подвергшихся воздействию радиации : Пособие для врачей. – М., 2007. – 15 с.
16. *Алекперов У.К., Гашимова У.Ф., Мирза-Заде Г.К., Мамедова А.О.* Модуляция наследственной и ненаследственной изменчивости антимутагенами // *Вестн. РАМН.* – 1995. – № 1. – С. 51–55.
17. *Hungerford D.A.* Leucocytes cultured from small inoculate of whole blood and preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCL // *Stain. Techn.* – 1965. – **40**. – P. 333–338.
18. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
19. *Болтіна І.В.* Частота аберацій хромосом в культурі лімфоцитів периферичної крові хворих на гліоми головного мозку при дії модельних мутагенів мітоміцину та диметаноату : Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 2005. – 18 с.
20. *Фомина Ж.Н., Лазюк Г.И.* Хромосомные aberrации в лимфоцитах периферической крови детского и взрослого населения Беларуси, пострадавшего в результате аварии на ЧАЭС // *Чернобыльская катастрофа: прогноз, профилактика, лечение и медико-психологическая реабилитация пострадавших* : Материалы IV Международ. конф. – Минск, 1995. – С. 224–225.
21. *Ковалева О.А.* Цитогенетические аномалии в соматических клетках млекопитающих // *Цитология и генетика.* – 2008. – **42**, № 1. – С. 58–72.
22. *Сусков И.И., Кузьменко Н.С., Иофа Э.Л., Нилова И.Н., Агаджанян А.В., Рубцова Г.А., Шевченко В.А., Кузина Н.Ю., Балева Л.С., Сипягина А.Е.* Дисгенотипные эффекты у детей, проживающих на территориях, загрязненных радионуклидами // *Генетические последствия чрезвычайных радиационных ситуаций* : Тез. докл. Международ. конф. – М., 2002. – С. 117–118.
23. *Семенов В.В.* Мутагенез, антимутагенез и регуляторная система клетки // *Вестн. РАМН.* – 1995. – № 1. – С. 41–43.
24. *Morgan W.F.* Nontargeted effects of ionizing radiation [Electronic resource] // Access mode: <http://www.nea.fr/html/rp/helsinki08/presentations>.
25. *Atkinson M.* Individual sensitivity [Electronic resource] // Access mode: <http://www.nea.fr/html/rp/helsinki08/presentations>.
26. *Бездробная Л.К., Цыганок Т.В., Романова Е.П., Тарасенко Л.В., Бухал А.В., Климкина Л.А.* Мутагенез в лимфоцитах крови у жителей сельской местности зоны отчуждения Чернобыльской АЭС // *Международ. журнал радиационной медицины.* – 2003. – **5**, № 1/2. – С. 118–127.
27. *Пілінська М.А., Дибський С.С., Дибська О.Б., Педан Л.Р.* Виявлення хромосомної нестабільності у нащадків батьків, опромінених внаслідок Чорнобильської катастрофи // *Цитология и генетика.* – 2005. – **39**, № 4. – С. 32–40.
28. *Bonassi S., Norppa H., Ceppi M. et al.* Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22,358 subjects in 11 countries // *Carcinogenesis.* – 2008. – № 29. – P. 1178–1183.

Поступила 18.08.11