

УДК 544.164, 543.422.3, 543.426, 547.7, 547.6, 577.323

Методики биотестирования на основе флуорометрического геномного анализа

© 2017 г. **В. С. СИБИРЦЕВ, КАНД. ХИМ. НАУК**

Университет ИТМО, Санкт-Петербург

E-mail: vs1969r@mail.ru

Поступила в редакцию 10.06.2017

Представлена схема обобщенного спектрофлуоресцентного анализа, позволяющего, используя систему из нескольких специально подобранных флуорофоров, оценивать не только количественное содержание ДНК в образце, но и изменения в ее структуре как первичной, так и пространственной. Рассмотрены варианты применения этой схемы для экспрессной оценки степени микробиологического загрязнения образцов, индивидуальной радиочувствительности живых организмов, а также генотоксичности различных продуктов, препаратов, факторов окружающей среды и др. (в том числе при совместном их действии).

Ключевые слова: флуоресцентный анализ ДНК, флуорофоры на ДНК, биотестирование.

Коды OCIS: 170.4580, 170.1530, 170.6280, 300.6390, 300.6280, 300.6550, 300.1030

ВВЕДЕНИЕ

В связи с ускоряющимся развитием технологий, увеличением объемов и ассортимента производимой и потребляемой человечеством продукции все более актуальной становится разработка достаточно простых, дешевых, экспрессных, достоверных, надежных и доступных для массового применения методов оценки санитарно-гигиенического состояния и общей степени экологического неблагополучия различных помещений, водоемов, территорий и др. Не менее актуальными являются и проблемы оценки общей степени токсичности промышленных и бытовых выбросов и стоков, мониторинга экологической безопасности уже выпускаемой продукции, а также выявления всех возможных как позитивных, так и негативных свойств новых либо модифицированных материалов, продуктов и препаратов.

Решение этих проблем может быть осуществлено разными способами. Однако наиболее приемлемым и адекватным в настоящее время признано использование для этих целей тестовых биосистем. В качестве последних могут быть применены как одноклеточные, так и более высокоорганизованные организмы (такие как планктон, растения, насекомые, раки, рыбы, крысы и др.), а также культуры клеток их тканей, крови и т.п. [1–17]. Одним из важнейших параметров, характеризующих состояние любого живого организма, является изменение в структуре его генома

(в отношении третичной и четвертичной структур генома наблюдающиеся даже вследствие обычных суточных изменений физиологического состояния большинства многоклеточных организмов). В свою очередь, эти изменения достаточно просто и быстро могут быть выявлены с помощью синтетических низкомолекулярных флуорофоров, чувствительных даже к достаточно небольшим изменениям в составе и структуре внутриклеточной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК).

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основой различных методик биотестирования, представленных в настоящей работе, стала описанная ниже методика экспрессной флуоресцентной оценки количества и пространственной структуры внутриклеточной ДНК. Для осуществления последней после изучения свойств большого числа потенциальных синтетических специфичных к ДНК флуоресцентных красителей [18–20] была выбрана система из двух коммерческих нуклеотид-специфичных флуорофоров – этидий бромид (ЭБ) и Хехст-33258 (Хт) (рисунок).

При разработке и апробации представленных здесь методик применялись флуориметры «Флуорат-02-3М» (Россия) и «ТКО-100» (Германия), а также спектрофлуориметры «Hitachi-850» (Япония), «RF-6000» (Япония) и «СМ-2203» (Беларусь). Все измерения фотолуминесценции проводились

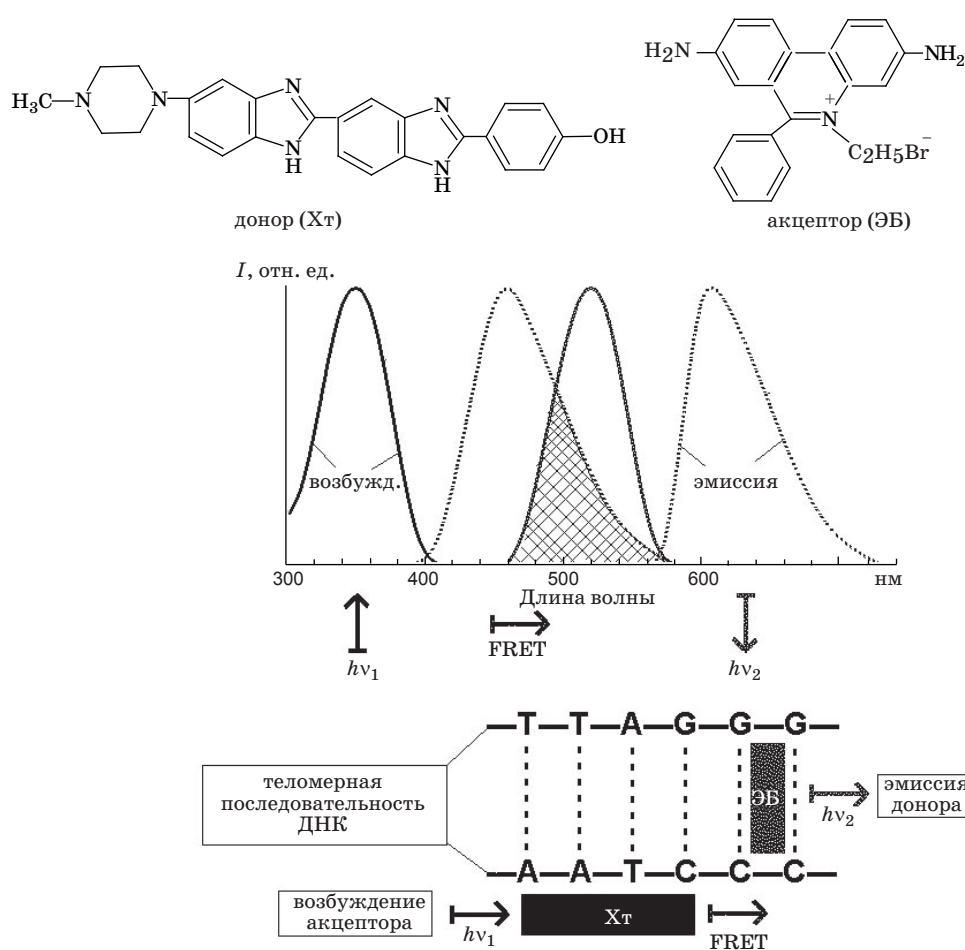


Схема флуоресцентного резонансного переноса энергии между молекулами Хт и ЭБ. I — интенсивность флуоресценции, $h\nu_1$ и $h\nu_2$ — кванты света: поглощаемый Хт и испускаемый ЭБ соответственно.

при 20–25 °С в стандартной флуоресцентной кювете квадратного сечения с длиной оптического пути 1 см и объемом раствора, доступном для измерений в пределах от 1,5 до 3,5 мл.

Состав и назначение Ст-буфера, Ст-ДНК, лизирующей смеси и других реактивов, использовавшихся при измерениях, были описаны в работе [20].

2. МЕТОДИКА ЭКСПРЕССНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ОЦЕНКИ КОЛИЧЕСТВА И ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ДНК

Система из флуорофоров ЭБ + Хт была выбрана для реализации базисной методики геномного анализа живых организмов по следующим двум основным причинам. Во-первых, потому что ЭБ является интеркалятором, прослаивающимся между двумя парами оснований двойной спирали полинуклеотида и специфичным, в основном, к молекулам ДНК вторичного и более высокого порядка организации (хотя и с некоторым предпочтением к участкам полинуклеотида, богатым гуанином

и цитозином). Тогда как Хт присоединяется к молекуле ДНК «снаружи» и предпочтительно специфичен к участкам двойной спирали полинуклеотида, содержащим три последовательно расположенных аденино-тиминовых (АТ) и одну гуанино-цитозиную (ГЦ) пары оснований [7].

Во-вторых, потому что в связанном с ДНК состоянии в спектральной области 300–1100 нм длины волн максимумов возбуждения флуоресценции и эмиссии Хт составляют 350 и 455 нм, а ЭБ — 520 и 605 нм соответственно. В результате между молекулами Хт и ЭБ при совместной сорбции их на полинуклеотиде может происходить флуоресцентный резонансный перенос энергии. То есть явление, когда при возбуждении флуоресценции молекул донора энергии (в данном случае Хт) светиться начинают не только они, но и молекулы акцептора энергии (в данном случае ЭБ), область длин волн возбуждения флуоресценции которого в значительной мере пересекается с областью длин волн флуоресцентной эмиссии донора (рисунок). Эффективность переноса энергии (E) в этом случае будет зависеть от расстояния (f) между молекулами

донора и акцептора энергии как $E = f_0^l / (f_0^l + f^l)$, где $f_0 = \text{const}$ — Форстеровский критический радиус, $l = 2, 4, 6$ в зависимости от вида диполь-дипольного взаимодействия между молекулами донора и акцептора.

Таким образом, при совместном использовании Хт и ЭБ можно оценивать не только общее количество, но и степень изменения структуры ДНК в пробе. В качестве практического примера одной из возможных схем анализа генетического материала с помощью системы «Хт + ЭБ» можно привести следующие.

2.1. Определение концентрации ДНК в пробе

К 0,1 мл пробы (цельная кровь тестовых макроорганизмов, суспензия тестовых микроорганизмов и др.) добавляется 1 мл лизирующей смеси [20]. После перемешивания раствор выдерживается в течение 5 мин. Добавлением к 0,1 мл полученного раствора 2 мл Ст-буфера [20] получается раствор 1. Затем определяются значения фоновых интенсивностей флуоресценции раствора 1: $I_{FH,1}$ (на длинах волн возбуждения и эмиссии, соответственно, 350 и 455 нм) и $I_{FE,1}$ (на длинах волн возбуждения и эмиссии 520 и 605 нм).

Добавлением 0,05 мл раствора, содержащего 10 мкг/мл Хт в Ст-буфере, к 1,05 мл раствора, содержащего 4,3 об % лизирующей смеси в Ст-буфере, получается раствор 2. Интенсивность флуоресценции этого раствора ($I_{FH,2}$) определяется на длинах волн возбуждения и эмиссии 350 и 455 нм.

Добавлением к 1,05 мл раствора 1 0,05 мл раствора, содержащего 10 мкг/мл Хт в Ст-буфере, получается раствор 3. Интенсивность флуоресценции этого раствора (I_H), определяемая на длинах волн возбуждения и эмиссии 350 и 455 нм, выше, чем $I_{FH} = I_{FH,1} + I_{FH,2}$, вследствие специфического взаимодействия Хт с ДНК, содержащейся в исходной пробе и ставшей доступной для красителя вследствие обработки исходной пробы лизирующей смесью.

Добавлением к 1,1 мл раствора 2 0,02 мл раствора, содержащего 60 мкг/мл Ст-ДНК [20], получается раствор 4. Интенсивность флуоресценции этого раствора (I_{DH}), определяемая на длинах волн возбуждения и эмиссии 350 и 455 нм, выше I_H вследствие взаимодействия Хт не только с ДНК, исходно содержащейся в пробе, но и с Ст-ДНК, добавленной к пробе.

По результатам измерений рассчитывается концентрация ДНК, исходно содержащейся в пробе

$$C_{DH} = gC_{SD}(I_H - I_{FH}) / (I_{DH} - I_H),$$

где $g = 246$ — разбавление исходной ДНК в растворе 4 по сравнению с исходной пробой, $C_{SD} = 3,3 \times 10^{-6}$ М — концентрация Ст-ДНК в растворе 4.

2.2. Определение степени изменения структуры ДНК в пробе

2.2.1. Определение коэффициента структуризации ДНК

Добавлением 0,05 мл раствора, содержащего 200 мкг/мл ЭБ в Ст-буфере, к 1,05 мл раствора, содержащего 4,3 об % лизирующей смеси в Ст-буфере, получается раствор 5. Интенсивность флуоресценции этого раствора ($I_{FE,2}$) определяется на длинах волн возбуждения и эмиссии 520 и 605 нм.

Добавлением к 1,05 мл раствора 1 0,05 мл раствора, содержащего 200 мкг/мл ЭБ в Ст-буфере, получается раствор 6. Интенсивность флуоресценции этого раствора (I_E), определяемая на длинах волн возбуждения и эмиссии 520 и 605 нм, выше, чем $I_{FE} = I_{FE,1} + I_{FE,2}$, вследствие специфического взаимодействия ЭБ с ДНК, содержащейся в исходной пробе.

Добавлением к 1,1 мл раствора 6 0,02 мл раствора, содержащего 60 мкг/мл Ст-ДНК в Ст-буфере, получается раствор 7. Интенсивность флуоресценции этого раствора (I_{DE}), определяемая на длинах волн возбуждения и эмиссии 520 и 605 нм, выше I_E вследствие взаимодействия ЭБ не только с ДНК, исходно содержащейся в пробе, но и с Ст-ДНК, добавленной к пробе.

По результатам измерений вычисляется коэффициент структуризации ДНК пробы

$$Ks = C_{DE} / C_{DH},$$

где $C_{DE} = gC_{SD}(I_E - I_{FE}) / (I_{DE} - I_E)$.

Изменение значения Ks должно отражать изменения в характере третичного и более высоких порядков организации структуры генома пробы, поскольку, как отмечено выше, ЭБ к ним существенно более специфичен, чем Хт.

2.2.2. Определение коэффициента эффективности переноса энергии флуорофоров на ДНК

На длинах волн возбуждения и эмиссии 350 и 605 нм определяется интенсивность флуоресценции раствора 3 (I_{FHE}).

Добавлением к 1,12 мл раствора 3 0,02 мл раствора, содержащего 200 мкг/мл ЭБ в Ст-буфере, получается раствор 8. На длинах волн возбуждения и эмиссии 350 и 605 нм определяется интенсивность флуоресценции раствора 8 (I_{HE}), обусловленная резонансным переносом энергии от первично возбужденных молекул Хт к адсорбированным вблизи них на ДНК молекулам ЭБ.

По результатам измерений вычисляется коэффициент эффективности переноса энергии флуорофоров на ДНК

$$Ke = (I_{HE} - I_{FHE}) / C_{DH}.$$

Изменение значения Ke указывает на изменение первичного и более высоких порядков органи-

зации структуры генома пробы несколько иным образом, чем в случае Ks . Так, в частности, как показано на рисунке, уменьшение Ke может отражать уменьшение длины теломерных участков генома. Последние у позвоночных животных и человека представляют собой многократно повторяющиеся на концах молекул ДНК фрагменты вида «TTAGGG», количество которых, уменьшаясь при каждом делении клетки вследствие неполной репликации ее ДНК, является максимальным ограничителем возраста живого организма.

При апробации описанной выше схемы анализа ДНК на двух группах крыс (по 30 особей в каждой) со средним возрастом 2 месяца и 1,5 года были получены с вероятностью 99% различающиеся значения усредненных по этим группам параметров Ks и Ke . Это соответствовало исходным предположениям, поскольку с возрастом состояние генетического материала живых организмов должно ухудшаться. Последнее происходит, в частности, за счет уменьшения длины теломерных участков генома, которое составило у рассматриваемых групп крыс в среднем 6300 пар нуклеотидов на один конец хромосомы при определении «классическим» методом с амплификацией посредством полимеразной цепной реакции, а также других изменений в структуре, в том числе пространственной, хромосомального нуклеопротеидного комплекса.

3. МЕТОДИКА ЭКСПРЕССНОЙ ОЦЕНКИ МИКРОБНОЙ ОБСЕМЕНЕННОСТИ ОБЪЕКТОВ

Общая микробная обсемененность является одним из важных показателей при оценке санитарно-гигиенического состояния водоемов, воздуха, рабочих зон и мест проживания граждан, при мониторинге процесса очистки воды для питьевых и технических нужд, при контроле качества на разных стадиях производства, хранения, транспортировки и реализации биотехнологической, лекарственной и иной продукции.

Стандартные методы, применяемые для определения этого показателя, в настоящее время включают такие стадии, как высевание анализируемого материала на питательную среду, его инкубирование при постоянной температуре в стерильных условиях в течение нескольких суток и последующий визуальный подсчет общего числа образовавшихся колоний микроорганизмов. Поэтому данные методы требуют для своей реализации значительного времени и специализированных стационарных условий.

Методика, предлагаемая в настоящей работе, позволяет проводить оценку общего содержания микроорганизмов практически в реальном времени и непосредственно на месте отбора проб. В самом общем виде эта методика заключается в следующем.

К отобранной во флуориметрическую кювету жидкой пробе (порядка 1 мл) добавляется лизи-

рующая смесь и определяется фоновая интенсивность флуоресценции образца I_{F1} . Затем в кювету добавляется раствор специфичного к ДНК флуорофора (например, коммерческий краситель DAPI [7]) с предварительно измеренной фоновой интенсивностью флуоресценции I_{F2} . Далее измеряется интенсивность флуоресценции I_D (обусловленная, в основном, взаимодействием введенного в пробу красителя с содержащейся в ней ДНК). Потом в качестве внутреннего стандарта к анализируемой смеси добавляется раствор с известной концентрацией Ст-ДНК в Ст-буфере. После этого определяется интенсивность флуоресценции полученной смеси (I_{SD}), которая выше I_D вследствие взаимодействия флуорофора не только с микробной ДНК, исходно содержащейся в анализируемой смеси, но и с Ст-ДНК, добавленной к пробе.

По результатам измерений вычисляется общее количество микроорганизмов в пробе как

$$C_M = a_0 + a_1 X,$$

где $X = (I_D - I_{F1} - I_{F2}) / (I_{SD} - I_D)$. В более широком диапазоне значений C_M рассчитывается по формуле

$$C_M = \sum a_i X^i, i = 0 - N,$$

где коэффициенты $a_0 - a_N$ определяются методом средних или методом наименьших квадратов [3] по данным калибровки, предварительно проводимой стандартным образом с использованием образцов с известным содержанием микроорганизмов.

Для реализации методики экспрессной оценки микробной обсемененности объектов использовался переносной микрофлуориметр ТКО-100 (Serva, Германия). С его помощью общее количество микроорганизмов в пробе, начиная с 20 кл/мл, определялось в течение не более 10 мин с погрешностью не более 30%.

В ряде случаев для регистрации окрашивания ДНК флуорофором вместо переносного прибора использовался стационарный спектрофлуориметр либо проточный цитофлуориметр, что позволило повысить чувствительность оценки микробной обсемененности проб.

Приведенная выше методика может быть использована также для оценки содержания микроорганизмов в газовых средах. Отбор проб в таком случае проводится барботированием определенного объема газа с помощью переносных аспираторов. Для оценки микробной обсемененности твердых поверхностей в рамках рассматриваемой методики предусмотрен отбор мазков с определенной площади этих поверхностей или смыва с них. При анализе «глубинной» микробной обсемененности твердых образцов использовалась предварительная гомогенизация этих образцов с водным буферным раствором.

Кроме того, представленную выше методику можно использовать для избирательного опреде-

ления содержания в пробах прокариотов либо эукариотов. Чтобы специфичный к ДНК флуорофор окрашивал лишь клетки прокариотов, к анализируемой пробе при обработке клеток вместо лизирующей смеси следует добавлять антибиотик, образующий каналы только во внешней стенке и мембране клетки. Тогда как для избирательного определения эукариотических клеток, содержащихся в анализируемой пробе, из общего количества микроорганизмов, содержащихся в пробе (определенного с помощью флуорофора на ДНК и лизирующей смеси), следует вычитать содержание прокариотических клеток, определенное в той же пробе с помощью флуорофора на ДНК и упомянутого выше антибиотика.

4. МЕТОДИКА ОЦЕНКИ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ

На основании описанной в разделе 2 настоящей работы схемы анализа ДНК была разработана методика предварительной оценки индивидуальной радиочувствительности живых организмов, состоящая в следующем.

У пациента до начала лучевой терапии или иного радиационного воздействия отбирают пробу крови (достаточно 1 мл), разбавляют Ст-буфером и делят на две равные части. Одну из них затем облучают, а другую (контрольную) — нет. После этого оба образца инкубируют для репарации первичных повреждений ДНК в течение 3 ч при 37 °С и обрабатывают лизирующей смесью.

Затем после добавления специфичного к ДНК флуорофора либо системы из нескольких флуорофоров (например, Хт и ЭБ) с помощью фотофлуориметра оценивают общее содержание и структуру генетического материала в каждом из образцов. Нормируют полученные значения на общее количество лейкоцитов в каждом из образцов и, сравнивая их, делают вывод о степени повреждающего воздействия, которое лучевая терапия или иное радиационное воздействие в выбранной дозе может оказать на конкретного пациента.

Описанная методика была апробирована на 53-х первичных больных лимфогранулематозом (пациентах Российского научного центра радиологии и хирургических технологий), показав 95%-ю корреляцию с результатами, полученными для тех же пациентов в тех же условиях методом учета нестабильных хромосомных aberrаций в культивируемых лимфоцитах. Последний метод, являясь одним из общепринятых для ранней оценки степени повреждающего воздействия радиационного облучения на человека, требует существенно больших затрат времени (7 суток вместо 4 ч), труда и материалов, чем методика, предложенная в настоящем разделе.

5. МЕТОДИКА БЫСТРОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ НА ЖИВЫЕ ОРГАНИЗМЫ РАЗЛИЧНЫХ ПРОДУКТОВ И ПРЕПАРАТОВ

На основании схемы анализа ДНК, описанной в разделе 2 настоящей статьи, была разработана методика быстрого выявления возможного генотоксического воздействия на человеческий и другие живые организмы различных продуктов питания, лекарственных препаратов, а также радиационных, химических и иных угнетающих факторов окружающей среды (в том числе в низких дозах и при сочетанном действии упомянутых продуктов, препаратов и иных угнетающих факторов).

Методика заключается в следующем. Группе животных (например крыс) одновременно или несколько раз в течение определенного времени (при моделировании хронического воздействия) вводят анализируемый продукт или препарат (один или в сочетании с другими продуктами, препаратами и факторами окружающей среды) либо подвергают воздействию того или иного угнетающего фактора. Ведение препаратов может проводиться с водой, пищей, внутривенно, внутримышечно и др.

При этом у животных регулярно отбирают пробы крови, в которых после обработки лизирующей смесью оценивают общее содержание и структуру генетического материала в соответствии с тем, как описано в разделе 2 настоящей работы. Затем полученные значения нормируются на общее количество лейкоцитов в каждой из проб. И на основании сравнения полученных результатов с аналогичными, определяемыми на контрольной группе животных, а также с результатами анализа проб всех участвующих в эксперименте животных до начала его проведения, делают вывод о наличии или отсутствии у анализируемой группы каких-либо достоверных изменений в структуре генома.

Описанная методика была апробирована при оценке лечебного и профилактического действия циклоферона (индуктора интерферона) при лучевой терапии фибросаркомы, при прогнозировании развития лейкопении вследствие применения различных видов лучевой терапии, при анализе действия на живые организмы в условиях Петербурга и Ленинградской области различных минеральных вод, а также при оценке экологического состояния ряда водоемов Ленинградской области. Во всех случаях наблюдалась корреляция полученных результатов с имевшим место в дальнейшем снижением продолжительности жизни испытуемых животных, а также с результатами, полученными при анализе тех же образцов методом учета нестабильных хромосомных aberrаций в культивируемых лимфоцитах и другими цитологическими методами.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ivanov S.D., Korytova L.I., Yamshanov V.A., Ilyn N.V., Sibirtsev V.S.* Leukopenia prognosis by radiation therapy of patients with Hodgkin's disease // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 1997. V. 16. № 2. P. 183–188.
2. *Ivanov S.D., Korytova L.I., Yamshanov V.A., Ilyn N.V., Sibirtsev V.S.* Leukopenia prognosis during radiation therapy in patients with Hodgkin's disease // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 1997. V. 16. № 4. P. 413–418.
3. *Sibirtsev V.S.* Analysis of benzo[a]pyrene deactivation mechanisms at rats // *Biochemistry (Moscow)*. 2006. V. 71. № 1. P. 90–98.
4. *Markosyan A.I., Akalyan Kh.S., Arsenyan F.G., Sukasyan R.S., Garibdzhanian B.T.* Synthesis and biological properties of 3-phenyl- and 3-phenethyl-5-methyl-5-ethyl-4-oxo-3,4,5,6-tetrahydrobenzo[h]quinazolines // *Pharmaceutical Chemistry J.* 2008. V. 42. № 6. P. 313–318.
5. *Shakurova É.R., Parfenova T.I., Sufiyarova R.Sh., Khalilova A.Z., Akhmetova V.R., Bashkatov S.A.* Synthesis and anti-inflammatory activity of acyl derivatives of taraxasterol // *Pharmaceutical Chemistry J.* 2008. V. 42. № 6. P. 319–321.
6. *Belakhov V.V., Shenin Yu.D.* Synthesis and antifungal activity of N-trialkylsilyl derivatives of nystatin // *Pharmaceutical Chemistry J.* 2008. V. 42. № 6. P. 322–325.
7. *Raevskii O.A., Razdol'skii A.N., Tonkopii V.D., Iofina I.V., Zagrebin A.O.* Classificatory and quantitative models of the relationship between the structures of chemical compounds and their toxicity for *Daphnia magna* // *Pharmaceutical Chemistry J.* 2008. V. 42. № 6. P. 329–334.
8. *Raevskii O.A., Razdol'skii A.N., Liplavskii Ya.V., Raevskaya O.E., Yarkov A.V.* Acute toxicity evaluation upon intravenous injection into mice: Interspecies correlations, lipophilicity parameters, and physicochemical descriptors // *Pharmaceutical Chemistry J.* 2012. V. 46. № 2. P. 69–74.
9. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. Миронова А.Н. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
10. *Velikorodov A.V., Ionova V.A., Degtyarev O.V., Suxenko L.T.* Synthesis and antimicrobial and antifungal activity of carbamate-functionized spiro compounds // *Pharmaceutical Chemistry J.* 2013. V. 47. № 12. P. 715–719.
11. *Vorob'eva A.I., Sultanova G.R., Bulgakov A.K., Zajchkovskij V.I., Kolesov S.V.* Synthesis and biological properties of copolymers based on N,N-diallyl-N,N-dimethylammonium chloride // *Pharmaceutical Chemistry J.* 2013. V. 47. № 11. P. 653–655.
12. *Anikina L.V., Vikharev Yu.B., Rozhkova Yu.S., Schkljaev Yu.V.* Synthesis and biological activity of 3-spiro[adamantane-2,3'-isoquinolines] // *Pharmaceutical Chemistry J.* 2013. V. 47. № 12. P. 707–710.
13. *Kedik S.A., Sakaeva I.V., Kochkina Yu.V., Eremin D.V., Panov A.V., Suslov V.V.* Synthesis and radioprotector activity of N-vinylpyrrolidone and 2-methyl-5-vinyltetrazole copolymers // *Pharmaceutical Chemistry J.* 2013. V. 47. № 12. P. 726–729.
14. *Surikova O.V., Mikhailovskii A.G., Odegova T.F.* Synthesis and antimicrobial and antifungal activities of 3-substituted 1-cyanomethyl-3,4-dihydroisoquinolinium chlorides // *Pharmaceutical Chemistry J.* 2015. V. 49. № 11. P. 711–713.
15. *Divava L.N., Klimenko A.I., Morkovnik A.S., Fetisov L.N., Kuz'menko T.A., Zubenko A.A., Bodryakova M.A., Bodryakov A.N.* Synthesis and antimicrobial and protistocidal activity of 1-(2-aryloxyethyl- and 2-halobenzyl)-3-(2-hydroxyethyl)-2-imino-1,3-dihydrobenzimidazolines // *Pharmaceutical Chemistry J.* 2015. V. 49. № 2. P. 91–95.
16. *Odaryuk V.V., Burakov N.I., Kanibolotskaya L.V., Kanibolotskii A.L., Odaryuk I.D., Lebedeva N.Yu., Poddubnaya E.N., Shendrik A.N.* Synthesis and antiradical and antibacterial activity of 4-(3',4'-dihydroxyphenyl)thiazole derivatives // *Pharmaceutical Chemistry J.* 2015. V. 49. № 7. P. 96–98.
17. *Sibirtsev V.S., Naumov I.A., Kuprina E.E., Olekhnovich R.O.* Use of impedance biotesting to assess the actions of pharmaceutical compounds on the growth of microorganisms // *Pharmaceutical Chemistry J.* 2016. V. 50. № 7. P. 481–485.
18. *Sibirtsev V.S., Glibin E.N., Ivanov S.D.* Variation of spectral properties of actinocin derivatives due to equilibrium transformations // *Russian J. Organic Chem.* 2000. V. 36. № 12. P. 1812–1818.
19. *Sibirtsev V.S., Tolmachev A.Yu., Suslov V.V., Garabadzhiu A.V., Traven' V.F.* Dependence of fluorescence properties of compounds from psoralen, angelicin, and carbazole series on the character of their terminal substituents // *Russian J. Organic Chem.* 2003. V. 39. № 6. P. 881–889.
20. *Сибирцев В.С.* Исследование механизмов изменения спектральных свойств при взаимодействии с ДНК соединений бензозольного, индольного и фенантридиумного рядов // *Оптический журнал.* 2017. Т. 84. № 5. С. 13–21.