

УДК 577.112.4:543.42

В.Т. ЧЕЩЕВИК, канд. биол. наук, доцент,
доцент кафедры биохимии и биоинформатики¹

Н.Г. ЧЕЩЕВИК

ассистент кафедры биохимии и биоинформатики¹

¹Полесский государственный университет,
г. Пинск, Республика Беларусь

Статья поступила 15.10.2025 г.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ УБИХИНОЛ-ЦИТОХРОМ С-ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ ТРОМБОЦИТОВ В МИКРОПРОБАХ

Спектрофотометрический метод определения активности убихинол-цитохром с-оксидоредуктазы (комплекс 3) митохондрий является одним из наиболее широко применяемых подходов. При измерении активности комплекса 3 тромбоцитов наиболее целесообразно проводить в микрообъемах (100 мкл) вследствие доступности небольшого количества тромбоцитов в результате забора крови. Наиболее подходящим способом извлечения ферментативной активности комплекса 3 митохондрий тромбоцитов является однократное замораживание/оттаивание суспензии тромбоцитов. Оптимальными параметрами измерения активности комплекса 3 митохондрий тромбоцитов являются температура 25⁰С, количество белка в пробе – 80 мкг, концентрации антимicina А – 90 мкМ, додецилубихинола – 100 мкМ, цитохрома С – 75 мкМ, которые обеспечивают стабильную скорость ферментативной реакции комплекса 3 в течение 20 мин в микрообъемах. Нормализация активности комплекса 3 по отношению к активности цитратсинтазы тромбоцитов возможна только с учетом факторов, потенциально оказывающих влияние на активность цитратсинтазы.

Ключевые слова: тромбоциты, митохондрии, убихинол-цитохром с-оксидоредуктаза, комплекс 3, цитратсинтаза, цитохром bc1 комплекс, электрон-транспортная цепь.

CHESHCHYCHYCH V.T., PhD in Biol. Sc., Associate Professor,
Associate Professor of the Department of Biochemistry and Bioinformatics¹

CHESHCHYCHYCH N.G., Assistant Lecturer of the Department of Biochemistry and Bioinformatics¹

¹Polessky State University, Pinsk, Republic of Belarus

DETERMINATION OF THE ACTIVITY OF MITOCHONDRIAL UBIQUINOL-CYTOCHROME C OXIDOREDUCTASE OF PLATELETS IN MI- CROSAMPLES

The spectrophotometric method for determining the activity of ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase (complex III) in mitochondria is one of the most widely used approaches. When measuring the activity of complex III in platelets, it is most practical to perform the measurements in microvolumes (100 µl) due to the limited availability of platelets from blood collection. The most suitable method for extracting the enzymatic activity of platelet mitochondrial complex III is a single freeze/thaw cycle of the platelet suspension. The optimal parameters for measuring the activity of platelet mitochondrial complex III are a temperature of 25°C, a protein amount in the sample of 80 µg, and concentrations of antimycin A at 90 µM, dodecylubiquinol at 100 µM, and cytochrome c at 75 µM, which ensure a stable enzyme reaction rate of

complex III for 20 minutes in microvolumes. Normalization of complex III activity relative to platelet citrate synthase activity is only possible taking into account potential factors.

Keywords: *platelets, mitochondria, ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase, complex III, citrate synthase, cytochrome bc1 complex, electron transport chain.*

Введение. Убихинол-цитохром с-оксидоредуктаза, или комплекс 3 электрон-транспортной цепи митохондрий, который присутствует у всех аэробных эукариот и многих бактерий, является одним из ключевых эволюционно фундаментальных компонентов аэробной биоэнергетики и обеспечивает перенос электронов с кофермента Q (убихинол) на цитохром С, сопряженный с одновременным транспортом протонов из матрикса митохондрий в межмембранное пространство, что приводит к генерации протонного градиента на внутренней митохондриальной мембране. При переносе каждых 2-ух электронов через молекулы комплекса 3 от убихинола к цитохрому С происходит поглощение 2-ух протонов из матрикса митохондрий и высвобождение 4-х протонов в межмембранное пространство в результате функционирования Q-цикла. В результате функционирования комплекса 3 и генерации протонного градиента происходит сопряжение процессов окисления и фосфорилирования, обеспечивая тем самым восполнение энергетических затрат клетки [1].

Помимо энергетической функции комплекс 3 дыхательной цепи митохондрий является одним из основных источников генерации активных форм кислорода, в частности, супероксиданион радикала, т.к. часть электронов может поступать на кислород непосредственного с третьего комплекса дыхательной цепи, минуя цитохром-с-оксидазу (комплекс 4) [2]. Генерация активных форм кислорода на 3-ем комплексе является одной из форм клеточной сигнализации и регуляции клеточных процессов в норме. В то же время различные нарушения дыхательной цепи от использования специфических ингибиторов 3-го комплекса дыхательной цепи до развития патологических состояний сопровождаются усилением генерации супероксиданион радикалов данным мультиферментным комплексом, что приводит к различным окислительным повреждениям митохондриальных и клеточных структур [2]. В частно-

сти, хорошо известна роль данного ферментативного комплекса в регуляции активации митохондриального пути апоптоза и развитии митохондриальных миопатий вследствие мутаций в белковых субъединицах, митохондриально-ассоциированных заболеваний [3].

Исследование активности убихинол-цитохром с-оксидоредуктазы является важным этапом при анализе биоэнергетики митохондрий и различных типов клеток в норме и установлении механизмов нарушений митохондриальной активности при различных патологических состояниях, в том числе митохондриально-ассоциированных заболеваниях [4]. Необходимость исследования активности комплекса 3 митохондрий тромбоцитов обусловлена непосредственным участием митохондрий в реализации коагуляционной функции тромбоцитов с одной стороны, а также в диагностике патологических состояний при использовании тромбоцитов как легко доступных клеточных маркеров нарушений биоэнергетики клеток органов и тканей с другой стороны [5, 6].

В настоящее время общепринятым методом оценки активности комплекса 3 дыхательной цепи митохондрий является кинетическое спектральное определение восстановления цитохрома С за счет переноса электронов с восстановленной формы додецилубихинона в результате функционирования данного мультиферментативного комплекса [7]. Двумя основными подходами являются определение активности комплекса в объемах с диапазоном от 1 до нескольких миллилитров и в объемах микролитрового диапазона с применением микропланшетных спектрофотометров [8, 9]. Несмотря на то, что оба метода представляются как универсальные вне зависимости от типа используемых клеток, имеющие свои преимущества и недостатки, при исследовании активности комплекса 3 дыхательной цепи в тромбоцитах необходимо учитывать их специфические особенности. В частности, способность тромбоцитов при воздействии различных

факторов (механических, физических, химических) вследствие активации образовывать агрегаты [10], что имеет важное значение для стандартизации и обеспечения воспроизводимости метода определения и наличие небольшого количества митохондрий (3-6 штук на клетку) по сравнению с обычными соматическими клетками (от нескольких сотен до нескольких тысяч митохондрий на клетку) [11], что необходимо учитывать при выборе оптимального количества биологического материала, а также следует принимать во внимание возможность получения лишь небольшого количества крови от одного пациента, из которой в дальнейшем выделяется плазма и в дальнейшем суспензии тромбоцитов, что накладывает свои ограничения на количество доступного биологического материала на исследование активности 3-го комплекса дыхательной цепи митохондрий.

В связи с этим целью данной работы являлась оптимизация спектрофотометрического метода определения активности митохондриальной убухинол-цитохром с-оксидоредуктазы (комплекса 3) тромбоцитов.

Материалы и методы. Для исследования осуществляли забор крови натощак у практически здоровых доноров с помощью вакуумных пробирок объемом 9 мл с использованием в качестве антикоагулянта K_2 -ЭДТА, который по сравнению с общепринятым цитратом натрия обеспечивает большую устойчивость тромбоцитарной массы к последующим манипуляциям. Кровь центрифугировали при 200g в течение 15 мин для получения плазмы, содержащей тромбоциты. Для осаждения тромбоцитов плазму переносили в полипропиленовые пробирки и центрифугировали при 2000g в течение 15 мин. Супернатант, безтромбоцитарную плазму, удаляли, а полученный осадок тромбоцитов путем осторожного пипетирования ресуспензировали в безтромбоцитарной плазме до достижения концентрации белка ~50 мг/мл. Концентрацию белка в пробах тромбоцитов определяли методом Брэдфорда [12].

Активность митохондриальной убухинол-цитохром с-оксидоредуктазы определяли спектрофотометрическим методом по восстановлению цитохрома С с использованием в качестве донора электрона додецилубихинола [9]. Восстановленный додецилубихинол получали в соответствии с методом [13] Ре-

акционная смесь включала 25 мМ калий-фосфатный буфер, 7.5, 6 мМ NaN_3 (блокирование активности комплекса 4), 100 мкМ Na_2 -ЭДТА, 0,025% Твин-20, цитохром С, образец. В контрольные пробы дополнительно добавляли 1 мкл спиртового раствора антимицина А для блокировки активности комплекса 3 с целью определения скорости неэнзиматического восстановления цитохрома С. В опытные пробы добавляли 1 мкл этанола, соответственно. Реакцию инициировали добавлением 1 мкл раствора додецилубихинола. Общий объем опытной и контрольной пробы составлял 100 мкл. Измерения оптической плотности осуществляли на длине волны 550 нм с интервалом 20 с в течение 20 мин. В результате измерения для каждого образца тромбоцитов получали 2 кинетические кривые в присутствии (контрольная проба) и отсутствии (опытная проба) антимицина А. Для каждой из кинетической кривой строили уравнение линейной регрессии и определяли угол наклона кривой, отражающий скорость изменения оптической плотности. Разницу между углами наклона кинетических кривых опытной и контрольной проб использовали для расчета активности комплекса 3 в соответствии с методом [7, 9]

Дополнительно также осуществляли измерение активности фермента цикла Кребса цитратсинтазы, активность которого применяется для стандартизации активности митохондриальной убухинол-цитохром с-оксидоредуктазы. Активность цитратсинтазы определяли спектрофотометрически [8, 9, 13]. Реакционная смесь включала 20 мМ Трис-буфер, pH 7.6 с 0,2% Тритон X-100, 100 мкМ дитиобис(2-нитробензойная кислота) (DTNB, реактив Элмана), 300 мкМ ацетил-КоА, образец (количество соответствует таковому в случае комплекса 3). Реакцию инициировали добавлением 5 мкл оксалоацетата (финальная концентрация 500 мкМ). Общий объем пробы составлял 100 мкл. Измерения оптической плотности осуществляли на длине волны 412 нм с интервалом 20 с в течение 20 мин. В результате измерения для каждого образца тромбоцитов получали кинетическую кривую, для которой строили уравнение линейной регрессии и определяли угол наклона кривой, отражающий скорость изменения оптической плотности. Для расче-

та активности цитратсинтазы осуществляли в соответствии с методом [9]

С целью осуществления сравнения образцов тромбоцитов осуществляли стандартизацию активности митохондриальной убинол-цитохром с-оксидоредуктазы по уровню активности цитратсинтазы. Количество измерений для каждой пробы составляло не менее трех. Построение кинетических кривых и уравнение линейной регрессии осуществляли в GraphPad Prism 8.0. Статистическую обработку и визуализацию данных осуществляли в RKWard 0.8.2 [14].

Результаты исследований и их обсуждение. Типичные кинетические кривые и построенные уравнения линейные регрессии для активности митохондриальной убинол-цитохром с-оксидоредуктазы (опытной и контрольной проб) и цитратсинтазы представлены на рисунке 1.

Как видно в случае с активностью комплекса 3 необходимость измерения контрольной пробы обусловлено наличием неэнзиматического восстановления цитохрома С (угол наклона имеет ненулевое значение) (рисунок 1 А). Введение антимицина А позволяет таким образом учитывать эффект химической (неэнзиматической) редукции цитохрома С при определении активности убинол-цитохром с-оксидоредуктазы тромбоцитов.

Для разрушения клеток и извлечения ферментов существует ряд подходов: механическое разрушение путем гомогенизации, осуществление циклов замораживания/оттаивания, использование мембранных

детергентов. В нашем исследовании гомогенизацию не применяли, т.к. каждый образец тромбоцитов содержал небольшое количество биологического материала. При использовании замораживания/оттаивания может также наблюдаться утрата ферментативной активности, поэтому в наших экспериментах мы использовали 1х, 2х и 3х циклы замораживания/оттаивания с целью тестирования эффектов данного подхода разрушения клеток на активность убинол-цитохром с-оксидоредуктазы и цитратсинтазы. Кроме того, для извлечения и определения активности данных ферментов мы использовали также экстракционный буфер, в состав которого входит 1,5% додецилмальтозид (мембранный детергент), для приготовления образцов тромбоцитов, т.к. в ряде работ на других типах клеток была показана эффективность данного метода [13]. Как видно из рисунка 2, увеличение количества циклов замораживания/оттаивания приводит к снижению скорости ферментативной реакции комплекса 3 и, наоборот, возрастанию скорости работы фермента цитратсинтазы. В то же время скорость комплекса 3 в пересчете на скорость цитратсинтазы существенно снижается при увеличении количества циклов замораживаний/оттаиваний тромбоцитов (рисунок 2 В.1).

Использование экстракционного буфера с содержанием 1,5% додецилмальтозида также приводит к частичному снижению скорости работы фермента убинол-цитохром с-оксидоредуктазы (комплекса 3) и в большей степени активности цитратсинтазы (рисунок 2 А.2, Б.2).

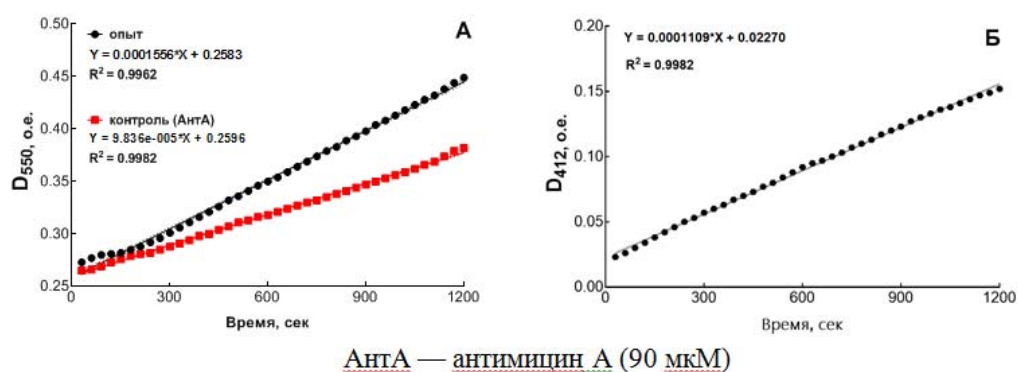


Рисунок 1. – Скорость ферментативной реакции убинол-цитохром с-оксидоредуктазы (комплекса III) (А) и цитратсинтазы (Б) митохондрий тромбоцитов человека

При этом перерасчет скорости ферментативной реакции комплекса 3 на скорость цитратсинтазы приводит к «кажущемуся» росту активности комплекса 3 (рисунок 2 В.2), что обусловлено именно существенным снижением активности цитратсинтазы при действии 1,5% додецилмальтозида в составе экстракционного буфера.

Дополнительно при обоих методах получения ферментативной активности в качестве последующего этапа мы применили центрифугирование при 600g в течение 10 мин с целью получения более очищенного супернатанта с ферментативной активностью. Измерение в супернатанте активности комплекса 3 и цитратсинтазы не выявило изменений оптической плотности реакционных смесей данных ферментов во времени (данные не представлены).

Еще одним из немаловажных факторов, обеспечивающих надежность определения их активности, — это оптимальное количество

белка для измерения активности ферментов. Нами была измерена скорость ферментативной реакции для следующего количества белка в пробе: 10, 20, 40, 80, 160 мкг (рисунок 3). Показано возрастание скорости ферментативной реакции как комплекса 3, так и цитратсинтазы с ростом количества белка, что подтверждает достаточность используемых концентраций субстратов в реакционной смеси. При этом при расчете на активность цитратсинтазы мы получили сопоставимые значения активности комплекса 3 (рисунок 3 В).

В литературе для измерения активности данных ферментов используют температуры проведения реакции 25°C, 30°C, 37°C [8, 9, 13]. При проведении ферментативных реакций при данных температурах мы также наблюдали возрастание активности комплекса 3 и цитратсинтазы, за исключением температуры проведения реакции 37°C (рисунок 4).

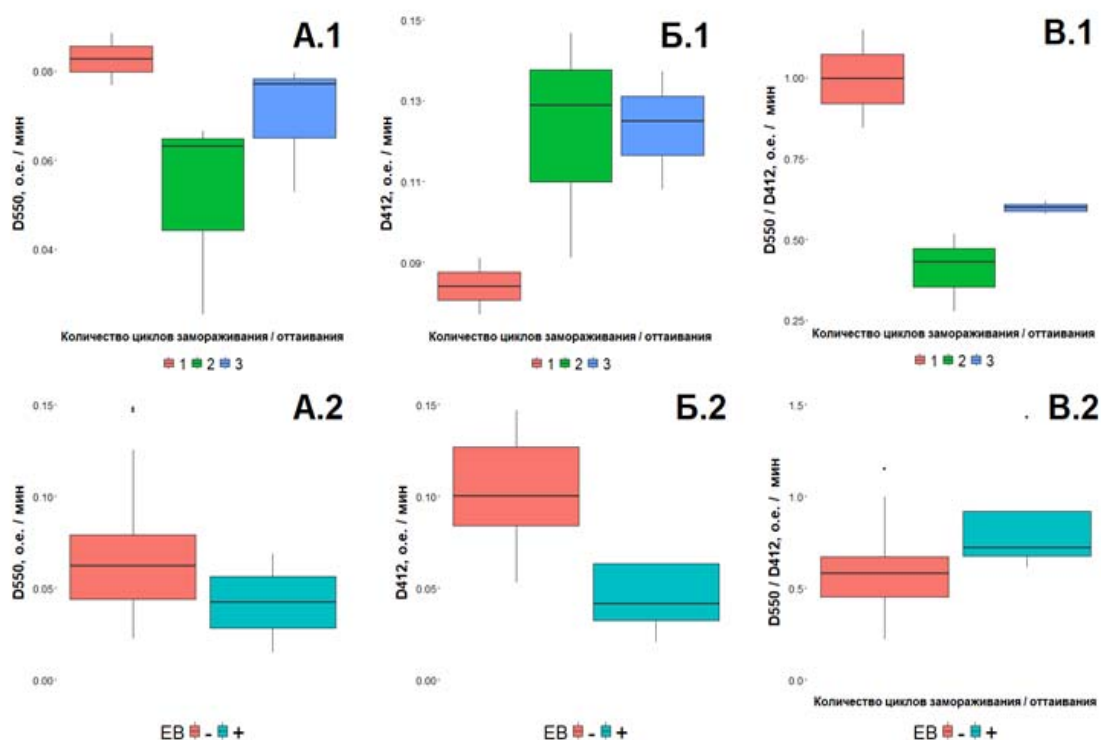


Рисунок 2. – Скорость ферментативной реакции комплекса III (А), цитратсинтазы (Б) и соотношение скоростей ферментов (В) митохондрий тромбоцитов человека при замораживании/оттаивании (1) и 1,5% додецилмальтозиде (ЕВ) (2)

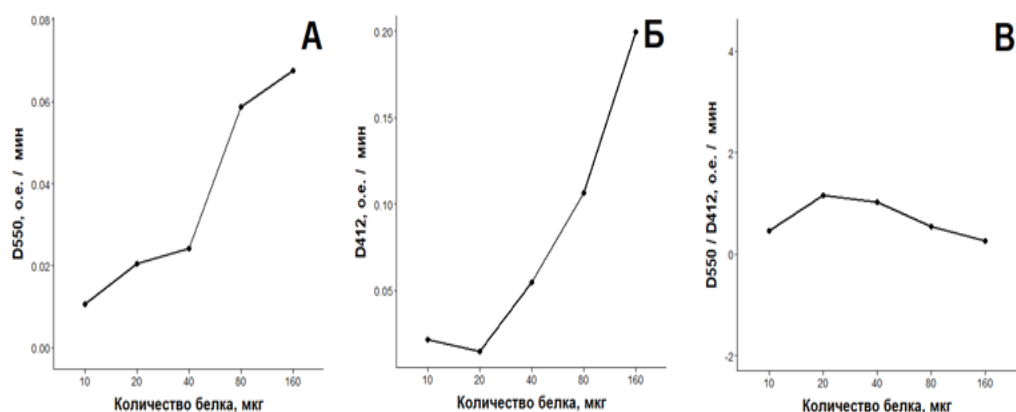


Рисунок 3. – Скорость ферментативной реакции комплекса III (А), цитратсинтазы (Б) и соотношение скоростей ферментов (В) митохондрий тромбоцитов человека при различных количествах белка в пробе

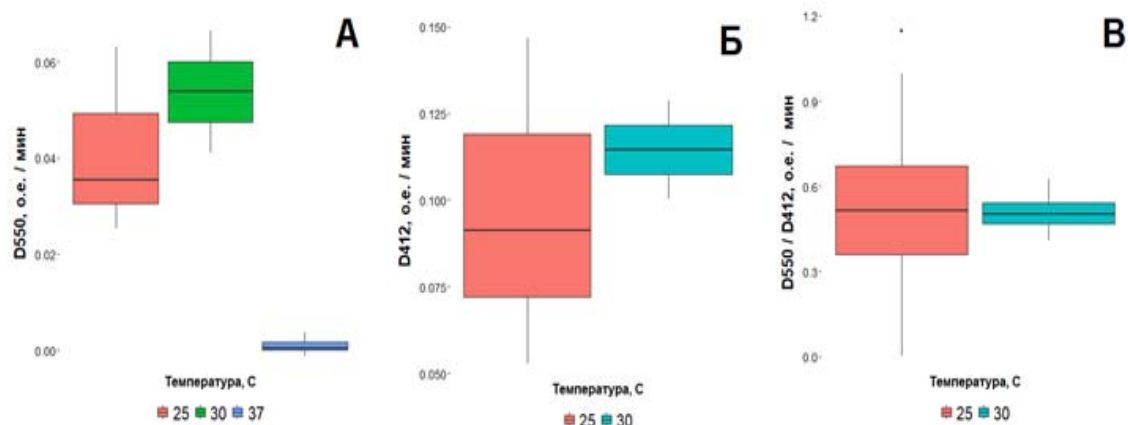


Рисунок 4. – Скорость ферментативной реакции в течение 20 мин комплекса III (А), цитратсинтазы (Б) и соотношение скоростей ферментов (В) митохондрий тромбоцитов человека при различных температурных режима

При температуре 37⁰С скорости ферментативных реакций комплекса 3 и цитратсинтазы были очень высокими в начальный период времени, но в дальнейшем в течение 20 мин вследствие истощения субстратов реакции наблюдали снижение угла наклона кинетических кривых ферментативных реакций комплекса 3 и цитратсинтазы, что приводит к общему снижению скорости ферментативной реакции в течение 20 мин.

С целью определения достаточного уровня концентраций субстратов (додецилубихинола, цитохрома С) и ингибитора антимицина А для измерения активности комплекса 3, которые предлагаются в литературе для со-

матических клеток, мы провели соответствующие эксперименты (рисунок 5).

Увеличение концентраций додецилубихинола и цитохрома С в 2 раза в реакционной смеси приводило лишь к статистически достоверному росту активности комплекса 3 в случае увеличения концентрации цитохрома С до 150 мкМ при двухкратном цикле замораживания/оттаивания тромбоцитов (рисунок 5 Б). В то же время увеличение концентрации ингибитора комплекса 3 антимицина А в реакционной смеси до 90 мкМ по сравнению с литературными данными приводило к существенному росту активности комплекса 3, измеряемой в тромбоцитах (рисунок 5 В).

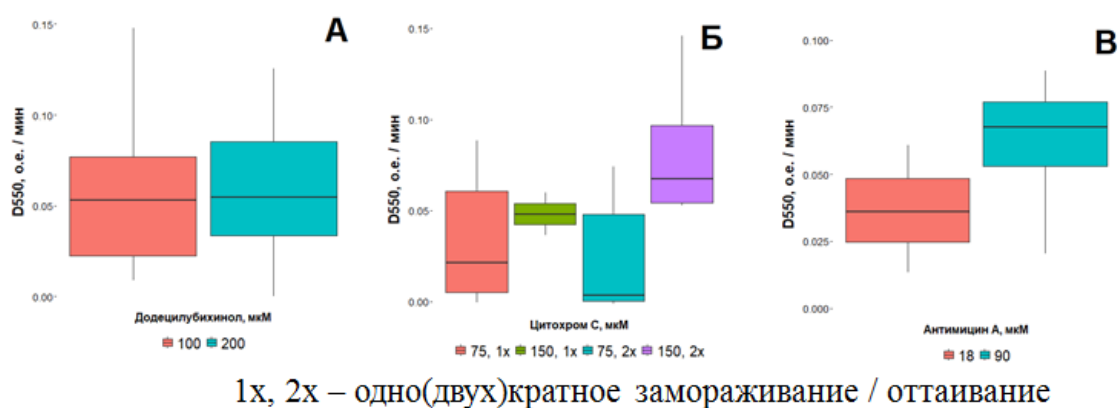


Рисунок 5. – Скорость ферментативной реакции комплекса 3 в течение 20 мин при различных концентрациях додецилубихинола (А), цитохрома С (Б) и антимицина А (В) митохондрий тромбоцитов человека

Закключение. Определение активности убихинол-цитохром с-оксидоредуктазы (комплекс 3) является необходимым этапом исследования функционального состояния электрон-транспортной цепи митохондрий при выявлении механизмов изменений биоэнергетики клеток при различных условиях и воздействиях [7].

Полярнографический метод не позволяет оценить активность данного комплекса и поэтому наиболее часто применяемым методом изучения активности комплекса 3 дыхательной цепи является спектрофотометрическое определение уровня восстановления цитохрома С в присутствии донора электронов – додецилубихинола [13]. Представленные в литературе подходы для исследования активности комплекса 3 данным методом во многих соматических клетках не учитывают ряд структурно-функциональных особенностей тромбоцитов, которые обладают потенциалом применения в качестве легко доступных клеточных маркеров состояния биоэнергетики органов и тканей [6]. Проведенные нами исследования демонстрируют, что измерения активности убихинол-цитохром с-оксидоредуктазы в тромбоцитах наиболее целесообразно проводить в микрообъемах (100 мкл) с использованием микропланшетных спектрофотометров вследствие доступности в результате забора крови небольшого количества тромбоцитов. Кроме того, одно-

кратный цикл замораживания/оттаивания является наиболее подходящим способом извлечения ферментативной активности комплекса 3 дыхательной цепи митохондрий, что также позволяет осуществлять замораживание полученных образцов тромбоцитов с целью последующего их изучения. Оптимальной температурой при длительных (20 мин) измерениях активности комплекса 3 в микрообъемах является 25°C , т. к. позволяет обеспечить достаточный уровень количества субстратов для сохранения линейности кинетической кривой изменения оптической плотности на протяжении всего интервала времени измерения. Приемлемым количеством белка в пробе является 80 мкг, т.к. с одной стороны это обеспечивает хороший уровень сигнала по сравнению с химическим (неэнзиматическим) восстановлением цитохрома С и стабильную линейность кинетической кривой скорости комплекса 3 при длительных интервалах измерений при используемых концентрациях субстратов, а с другой стороны позволяет обеспечить возможность релевантного измерения активности комплекса 3 в случае вероятного патологического изменения активности при заболеваниях. Кроме того, результаты исследований показывают, что количество субстратов в реакционной смеси, которые приведены в литературе, для измерения активности комплекса 3 в различных типах соматических клеток, явля-

ется достаточным и в случае тромбоцитов. Лишь удвоение концентрации цитохрома С проявляет статистически значимый эффект при двухкратном цикле замораживания/оттаивания тромбоцитов, что, вероятно, обусловлено большей степенью повреждений митохондрий и возможной утратой компонентов электрон-транспортной цепи, в частности, цитохрома С. Кроме того, нами была выявлена необходимость существенного повышения в контрольной пробе концентрации ингибитора 3 комплекса антимицина А в случае тромбоцитов по сравнению с другими типами соматических клеток с целью более точного определения степени неэнзиматического восстановления цитохрома С. Помимо классического способа выражения скорости ферментативной реакции убихинол-цитохром с-оксидоредуктазы в виде удельной активности относительно концентрации белка в пробе в качестве способа нормализации ферментативной активности предлагается определение отношения активности комплекса 3 к активности цитратсинтазы, уровень которой позволяет контролировать степень извлечения ферментативной активности из биологических образцов с использованием тех или иных способов нарушения целостности клеток [9]. В то же время наши исследования демонстрируют, что в случае измерения активности цитратсинтазы в микрообъемах также необходимо учитывать ряд факторов, оказывающих влияние на ее активность. Кроме того, также необходимо принимать во внимание возможное изменение активности самой цитратсинтазы при патологических состояниях.

Исследования проведены при финансовой поддержке Министерства образования Республики Беларусь (договор № 65 от 05.05.2021) в рамках ГПНИ «Биотехнологии-2» (Рег. № НИР 20241017).

Список использованных источников

1. Crofts, A. R. The Cytochrome bc1 Complex: Function in the Context of Structure / A. R. Crofts // Annual Review of Physiology. – 2004. – Vol. 66 – P. 689–733.
2. Turrens, J. F. Formation of Reactive Oxygen Species in Mitochondria / J. F. Turrens // Mitochondria: The Dynamic Organelle // J. F. Turrens ; ed. by S. W. Schaffer, M.-S. Suleiman. – New York, NY : Springer, 2007. – P. 185–196.
3. Suleiman, M.-S. The Apoptotic Mitochondrial Pathway – Modulators, Interventions and Clinical Implications / M.-S. Suleiman, S. W. Schaffer // Mitochondria: The Dynamic Organelle // M.-S. Suleiman, S. W. Schaffer ; ed. by S. W. Schaffer, M.-S. Suleiman. – New York, NY : Springer, 2007. – P. 271–290.
4. DiMauro, S. A critical approach to the therapy of mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation diseases : Mitochondrial Disease / S. DiMauro, P. Rustin // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. – 2009. – Vol. 1792, № 12. – P. 1159–1167.
5. Impairment of platelet mitochondrial respiration in patients with chronic kidney disease with and without diabetes / G. Mihaela-Roxana, S.-L. Theia, A. Oana-Maria [et al.] // Mol Cell Biochem. – 2025. – Vol. 480, № 8. – P. 4745–4755.
6. Platelet bioenergetics correlate with muscle energetics and are altered in older adults / A. Braganza, C. G. Corey, A. J. Santanasto [et al.] // JCI Insight. – Vol. 4, № 13. – P. e128248.
7. Steady-state kinetic analysis of mitochondrial respiratory enzymes from bovine heart mitochondria / D. Kim, E. Ko, M. Choi, S. Shin // Applied Biological Chemistry. – 2021. – Vol. 64, № 1. – P. 54–60.
8. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells / M. Spinazzi, A. Casarin, V. Perlegato [et al.] // Nat Protoc. – 2012. – Vol. 7, № 6. – P. 1235–1246.
9. Mitochondrial complex III activity: from invasive muscle biopsies to patient-friendly buccal swab analysis / T. Somers, N. A. E. Allard, S. Siddiqi [et al.] // Sci Rep. – 2023. – Vol. 13, № 1. – P. 9638.
10. Why platelet mechanotransduction matters for hemostasis and thrombosis / O. Oshinowo, S. S. Azer, J. Lin, W. A. Lam // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2023. – Vol. 21, № 9. – P. 2339–2353.
11. Role of Platelet Mitochondria: Life in a Nucleus-Free Zone / H. Melchinger, K. Jain, T. Tyagi, J. Hwa // Front. Cardiovasc. Med. – 2019. – Vol. 6 – P. 1–11.

12. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // Analytical Biochemistry. – 1976. – Vol. 72, № 1. – P. 248–254.
13. Barrientos, A. Evaluation of the mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation system using polarography and spectrophotometric enzyme assays / A. Barrientos, F. Fontanesi, F. Díaz // Curr Protoc Hum Genet. – 2009. – Vol. 19 – P. 1–13.
14. RKWard: A Comprehensive Graphical User Interface and Integrated Development Environment for Statistical Analysis with R / S. Rödiger, T. Friedrichsmeier, P. Kapat, M. Michalke // Journal of Statistical Software. – 2012. – Vol. 49 – P. 1–34.

Received 15.10.2025