

## Фосфотрансферазная активність препаратів IgG із сыворотки крові больних системної червоної волчанкою

Ю. Я. Кит, В. А. Ковалева, В. А. Рихтер<sup>1</sup>

Інститут біології клітки НАН України  
Ул. Драгоманова, 14/16, Львов, 79005, Україна

E-mail: kit@biochem.lviv.ua

<sup>1</sup>Новосибірський інститут біоорганічної хімії Сибірського відділення РАН  
Пр. Лаврентьєва, 8, Новосибірськ, 630090, Російська Федерація

---

*Із сыворотки крові больних системної червоної волчанкою послідовними хроматографіями на колонках з протеїн-А-сефарозою і DEAE-сорбентом отриман електрофоретически гомогенний препарат IgG (препарат 1). Із цього препарату хроматографією на колонке з АТФ-сефарозою виділена фракція IgG (препарат 2), яка має властивість к АТФ. При інкубації препаратів 1 і 2 з  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$  спостерігалось утворення низькомолекулярних  $^{32}\text{P}$ -мічених продуктів. В складі цих продуктів виявлені фосфоліпиди, які утворюють шість фракцій при розділенні двохмерної тонкослойної хроматографією. В присутстві ліпідів фосфорилування IgG в досліджуваних препаратах не помічено. Після видалення ліпідів гелі-фільтрацією в буфері, що містить 5 % діоксана, відбувається фосфорилування Н- і L-ланцюгів IgG. Додавання в реакційну середу, що містить 0,018 мкМ  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ , 1 мкМ «холодного» АТФ збільшувало включення  $^{32}\text{P}$  в Н-ланцюг IgG.*

---

**Введення.** Відомо, що в організмі людей присутні імуноглобуліни, які мають властивість до власних антигенів (білків, ліпідів, нуклеїнових кислот). Такі імуноглобуліни отримали назву аутоантител (аАТ) [1, 2]. В невеличкій кількості аАТ присутні у здорових людей (в нормі), але їх концентрація істотно зростає при аутоімунних захворюваннях [2, 3]. До них відносять і аАТ, які здатні каталізувати хімічні перетворення антигенів, — «природні» абзими, або каталітично активні антитела [4]. Найбільш дослідженими абзимами є аАТ з пептид- і протеїн-гідролізуючою активністю, виявлені в крові больних астмою і аутоімунним тиреоїдитом [5], а також аутоантитела до ДНК- і РНК-гідролізуючої активності, виявлені у больних системної червоної волчанкою (СКВ) [6]. Недавно встановлено, що в молоці здорових рожець присутні ім-

муноглобуліни (IgG і sIgA), які здатні гідролізувати ДНК і АТФ [7—9]. Крім гідролізуючих аАТ, в молозиві і молоці виявлені секреторні імуноглобуліни класу А (sIgA) з властивістю до АТФ, які мають протеїнкіназну активність (sIgA-абзими) [10]. При очищенні sIgA-абзимів нами виділені комплекси sIgA з ліпідами [11, 12] і було показано, що при інкубації цих комплексів з  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$  відбувається утворення фосфоліпідів [11], що вказує на ліпідкіназну активність sIgA [12]. Гелі-фільтрація препаратів sIgA в присутстві 5 % діоксана призводила до розрушення комплексів і стимуляції протеїнкіназної активності імуноглобулінів [11].

По характеру властивостей до антигенів (АТФ, казеїну, фосфоліпідів) sIgA-абзими близькі до своїх властивостей до антифосфоліпідних аутоантител [13].

Відомо, що антифосфоліпідні аутоантитела в значній кількості присутні в крові больних СКВ [2, 3]. Не виключено, що, по

крайней мере, некоторая часть этих аутоантител может обладать фосфотрансферазной активностью.

Целью нашей работы было изучение фосфотрансферазной (липидкиназной и протеинкиназной) активности препаратов IgG, выделенных из сыворотки крови больных СКВ.

**Материалы и методы.** Образцы сыворотки крови больных СКВ женщин любезно предоставлены М. А. Сартаковой (Институт клинической иммунологии СО РАМН, Россия). Антитела выделяли хроматографией сыворотки на колонке, содержащей протеин-А-сефарозу («Sigma», США), согласно работе [7]. Фракцию IgG дополнительно очищали ионообменной хроматографией на колонке с Fractogel TSK DEAE-650 (M), как описано в работе [9]. В результате очистки получен электрофоретически гомогенный препарат IgG (препарат 1). Для выделения аАТ, обладающих сродством к АТФ, использовали АТФ-сефарозу, синтезированную иммобилизацией (8-аминооктил)- $\gamma$ -амида АТФ на сефарозу, активированную бромцианом по методу Д. В. Семенова (НИБОХ СО РАН, Россия). Хроматографию проводили согласно работе [10]. Для этого препарат 1 диализовали против 20 мМ трис-НСl, рН 6,8, 3 мМ MgCl<sub>2</sub>. Диализат, содержащий 7 мг белка, наносили на колонку с АТФ-сефарозой (3 мл), уравновешенную буфером для диализа, и промывали колонку тем же буфером. Белки элюировали линейным градиентом концентрации NaCl (0—0,5 М). Фракции белков диализовали против 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, 50 мМ NaCl, 3 мМ MgCl<sub>2</sub> (препарат 2).

**Фосфотрансферазную активность** препаратов IgG определяли согласно работе [11]. Для этого отбирали аликвоты, содержащие 30 мкг белка, и инкубировали с 30 мкКи [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ («Биосан», Россия) в течение 30 мин при температуре 37 °С. Реакцию останавливали, добавляя равный объем 20 %-й ТХУ. Осадок промывали ацетоном и растворяли в буфере, содержащем 2 % SDS, 50 мМ трис-НСl, рН 6,8, и 10 % глицерина. Продукты фосфорилирования разделяли SDS-электрофорезом в градиенте концентрации ПААГ (7—20 %) [14]. Гели окрашивали Кумасси R-250, высушивали и автордиографировали.

**Наличие <sup>32</sup>P-меченных липидов** в составе продуктов фосфорилирования препаратов определяли по [11]. Для этого кислотонерастворимые осадки фосфорилированных препаратов IgG промывали ацетоном и высушивали. Липиды экстрагировали в буфере, содержащем хлороформ:метанол (2:1), и разделяли тонкослойной хроматографией (ТСХ) на пластинах Kieselgel 60 («Merck», Германия) в системе хлороформ:метанол:7 М NH<sub>4</sub>OH (60:35:5).

Для более детального изучения состава <sup>32</sup>P-меченных фосфолипидов экстракты разделяли двухмерной ТСХ, где в первой мере использовали систему хлороформ:метанол:вода (10:10:3), а во второй — хлороформ:метанол:7 М NH<sub>4</sub>OH (60:35:5). Пластинки высушивали и автордиографировали.

**Протеинкиназную активность** IgG определяли после удаления из препаратов АТ липидов. Для этого препарат 1 подвергали гель-фильтрации на колонке с сорбентом Fractogel TSK HW-55 (F) (185 мм) в буфере, содержащем 0,15 М NaCl, 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, 5 % диоксана. Фракцию IgG диализовали против 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, 50 мМ NaCl, 3 мМ MgCl<sub>2</sub> и инкубировали с 30 мкКи [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ (0,018 мкМ) в течение 30 мин (37 °С) в присутствии 1 мкМ АТФ («Sigma») или без него. Реакцию останавливали добавлением равного объема 20 %-й ТХУ. Осадок промывали ацетоном и разделяли SDS-электрофорезом в 12 %-м ПААГ. Гели окрашивали Кумасси R-250, высушивали и автордиографировали.

**Результаты и обсуждение.** СКВ является одним из наиболее распространенных хронических аутоиммунных заболеваний, при этом до 80 % больных составляют женщины. Для этой болезни характерно наличие в крови больных высоких титров аутоантител к двухцепочной ДНК (анти-ДНК аАТ), ядерным белкам, фосфолипидам [2, 3]. Установлено, что в пуле анти-ДНК аАТ больных СКВ присутствуют IgG, обладающие способностью гидролизовать ДНК (ДНК-гидролизующие абзимы) [4, 6]. Абзимы с аналогичной активностью были обнаружены также в молоке здоровых по медицинским показаниям рожениц [7, 8]. Ранее нами показано, что, кроме абзимов с нуклеазной активностью, в молозиве и молоке присутствуют секреторные иммуноглобулины класса А (sIgA-абзимы), обладающие фосфотрансферазной (протеин- и липидкиназной) активностью [10—12, 15]. Принимая во внимание широкое разнообразие аАТ, возникающих при СКВ, мы предположили, что абзимы с фосфотрансферазной активностью могут присутствовать и в сыворотке крови больных СКВ.

Для проверки этого предположения из сыворотки крови больных СКВ хроматографией на протеин-А-сефарозе выделяли фракцию IgG. Для удаления возможных примесей фракцию дополнительно очищали ионообменной хроматографией на DEAE-сорбенте [8, 9]. В результате получены препараты аАТ, содержащие более 90 % IgG (рис. 1, б, дорожка 1). Поскольку абзимы с фосфотрансферазной активностью обладают сродством к АТФ [10], то в дальнейшем препараты IgG подвергали хроматографии на колонке с АТФ-сефарозой. Обна-

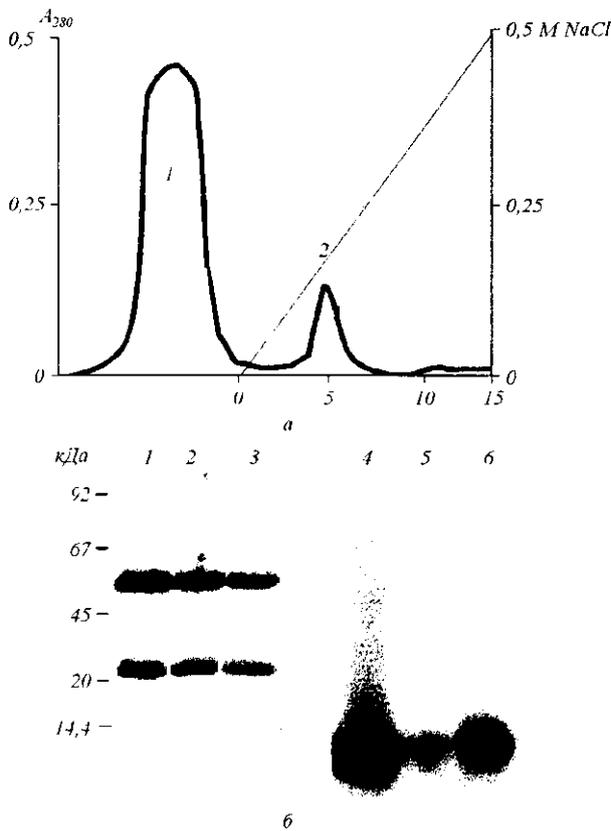


Рис. 1. Хроматография IgG препарата 1 на колонке с АТФ-сефарозой и электрофоретический анализ продуктов фосфорилирования фракций: а — профиль элюции белков с колонки (пик 1 — IgG, не обладающие сродством к сорбенту; пик 2 — IgG, элюированные с сорбента линейным градиентом NaCl); б — SDS-электрофорез в градиенте концентрации ПААГ (7—20 %) продуктов фосфорилирования (1—3 — гель, окрашенный Кумаси R-250; 4—6 — радиоавтограф геля; 1, 4 — исходный препарат IgG (препарат 1); 2, 5 — фракция IgG, не обладающая сродством к АТФ-сефарозе (пик 2); 3, 6 — IgG со сродством к АТФ-сефарозе (пик 1); слева указаны значения молекулярных масс белковых маркеров)

ружено, что основное количество IgG не связывалось с АТФ-сефарозой (рис. 1, а). Лишь небольшая часть аАТ связывалась с сорбентом и элюировалась линейным градиентом NaCl (рис. 1, а). Анализ профиля элюции показал, что IgG выделенной фракции обладают низким сродством к АТФ-сефарозе в отличие от sIgA-абзимов молока, для которых характерно высокое сродство к этому сорбенту [10, 13]. После инкубации фракций с  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$  и электрофоретического разделения продуктов фосфорилирования в исходном препарате иммуноглобулинов и во фракции IgG, обладающей сродством к АТФ, были обнаружены низкомолекулярные  $^{32}\text{P}$ -

меченные продукты (рис. 1, б, дорожки 4, б). В составе фракции IgG, не обладающей сродством к АТФ, фосфорилированного продукта было существенно меньше (рис. 1, б, дорожка 5). При этом ни для одной из фракций не выявлено фосфорилирования иммуноглобулинов (рис. 1, б).

В дальнейшем мы предприняли попытку установить природу  $^{32}\text{P}$ -меченных продуктов. Поскольку электрофоретическая подвижность этих продуктов была близка по подвижности к  $^{32}\text{P}$ -меченым фосфолипидам, образующимся при инкубации препаратов sIgA молока человека с  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$  [11, 12, 15], то не исключено, что обнаруженные радиоактивные продукты могли также содержать фосфолипиды. Для проверки этого предположения, фракции иммуноглобулинов инкубировали с  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$  и белки осаждали 10 % ТХУ. Осадок промывали ацетоном и липиды экстрагировали смесью хлороформ:метанол (2:1). После разделения экстракта ТСХ обнаружены три фракции  $^{32}\text{P}$ -меченных фосфолипидов с  $R_f$  0,22; 0,45; и 0,59 (рис. 2, а). При этом существенная часть радиоактивных продуктов не разделялась в использованной нами системе и оставалась в месте нанесения образца.

Затем, чтобы детальнее проанализировать состав экстракта, мы использовали двухмерную ТСХ. Для более полного разделения липидов в первом направлении продукты разделяли в системе хлороформ:метанол:вода (10:10:3) согласно работе [16]. Во втором направлении продукты разделяли в системе для анализа фосфолипидов [11]. В результате такого разделения обнаружены девять фракций радиоактивно меченных фосфолипидов, из которых шесть являются мажорными (рис. 2, б). Из полученных результатов следует, что в препаратах IgG происходит фосфорилирование липидов в присутствии  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ . Поскольку выделенные препараты состоят из IgG (рис. 1), то наиболее вероятно, что липиды присутствуют в составе этих препаратов в виде иммунных комплексов. Ранее подобные комплексы выявлены нами в составе препаратов sIgA, обладающих фосфотрансферазной активностью [11]. Гель-фильтрация препаратов sIgA в растворах, содержащих 5 %-й диоксан, разрушала эти иммунные комплексы, после чего sIgA приобретали способность к аутофосфорилированию в присутствии  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$  [11, 15]. Не исключено, что аналогичным свойством могут обладать и препараты IgG, выделенные из крови больных СКВ. Для проверки этого предположения препарат IgG подвергали гель-фильтрации в присутствии 5 %-го диоксана. В результате разделения получен очищенный от липидов препарат IgG (рис. 3), который в дальнейшем использовали для исслед-

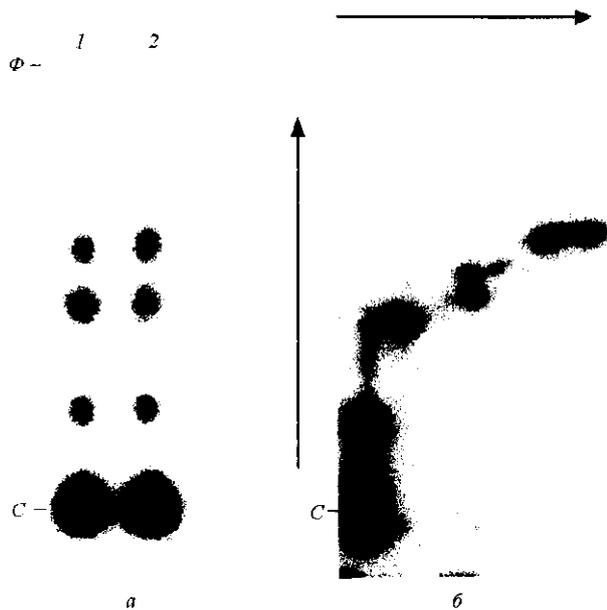


Рис. 2. Анализ  $^{32}\text{P}$ -меченных липидов методом тонкослойной хроматографии на пластине Kieselgel 60 (радиоавтограф пластин): *a* — одномерная ТСХ  $^{32}\text{P}$ -липидов в системе хлороформ:метанол:7 М  $\text{NH}_4\text{OH}$  (60:35:5) (*1* — исходный препарат IgG; *2* — IgG со сродством к АТФ-сефарозе); *б* — двухмерная ТСХ  $^{32}\text{P}$ -липидов (в первой мере — разделение в системе хлороформ:метанол:вода (10:10:3), во второй — в системе хлороформ:метанол:7 М  $\text{NH}_4\text{OH}$  (60:35:5)). Стрелками указаны направления хроматографий; горизонтальная стрелка — первая мера; вертикальная стрелка — вторая мера; С — место нанесения образца;  $\Phi$  — фронт элюента

дования протеинкиназной активности. Ранее нами установлено, что добавление 1 мкМ АТФ в реакционную среду, содержащую  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ , существенно увеличивало фосфорилирование sIgA-абзимов [11, 15]. В связи с этим реакцией фосфорилирования IgG проводили с добавлением или без добавления в реакционную среду АТФ. Обнаружено, что в отличие от неочищенных от липидов препаратов аАТ, где фосфорилирования IgG не наблюдалось (рис. 1, дорожки 4—6), очищенные от липидов IgG обладали способностью к аутофосфорилированию в присутствии  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$  (рис. 3, дорожка 3). При этом включение  $^{32}\text{P}$  происходило как в тяжелые (H), так и в легкие (L) цепи иммуноглобулинов. Добавление в реакционную среду 1 мкМ «холодного» АТФ существенно увеличивало фосфорилирование H-цепей IgG (рис. 3, дорожка 4), что также характерно и для sIgA-абзимов [11, 15].

В результате работы нами установлено, что в крови людей, больных СКВ, присутствуют IgG, обладающие сродством к АТФ. Эти аутоантитела выделяются из сыворотки крови совместно с липидами и, по-видимому, образуют с ними иммунные комплексы. В составе комплексов происходит фосфорилирование липидов в присутствии  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ , что указывает на липидкиназную активность IgG. Разрушение иммунных комплексов и удаление липидов приводит к фосфорилированию полипептидов IgG с наибольшим включением  $^{32}\text{P}$  в H-цепи иммуноглобулинов.

Подобные свойства характерны также и для ранее обнаруженных нами в молоке человека sIgA-абзимов. Кроме подобия свойств, эти аАТ обладают и существенными различиями. В первую очередь, аАТ — носители фосфотрансферазной активности в молоке и сыворотке, представлены разными изотипами (sIgA и IgG). Кроме этого, IgG больных СКВ обладают более низким сродством к АТФ-сефарозе

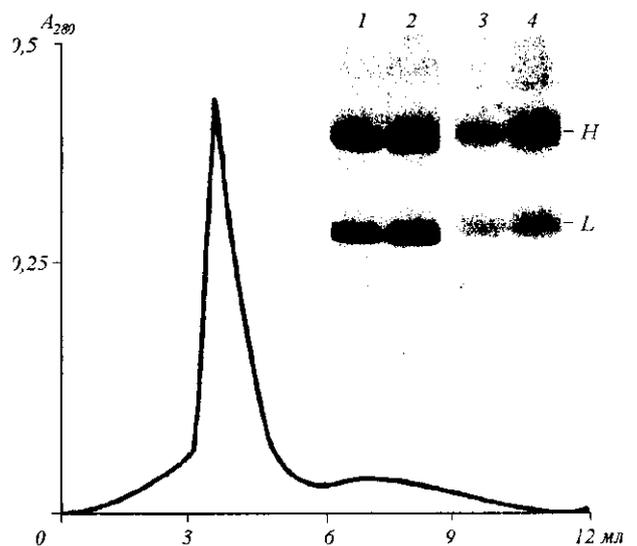


Рис. 3. Гель-фильтрация препарата 1 и фосфорилирование фракции IgG. Разделение проводили на колонке Fractogel TSK HW-55 (F) (185 мм) в 0,15 М NaCl, 20 мМ трис-HCl, pH 7,5, 5 %-й диоксан. Фракцию IgG инкубировали в присутствии 0,018 мкМ  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$  с добавлением 1 мкМ АТФ или без него. На вставке приведен электрофоретический анализ продуктов фосфорилирования: *1, 2* — гель, окрашенный Кумасси R-250; *3, 4* — радиоавтограф геля; *1, 3* — IgG +  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ ; *2, 4* — IgG +  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$  + АТФ. H и L — соответственно тяжелые и легкие цепи IgG

по сравнению с sIgA-абзимами молока.  $^{32}\text{P}$ -меченные фосфолипиды, образующиеся при фосфорилировании препаратов sIgA и IgG, значительно отличаются по подвижности при разделении одномерной ТСХ. Сложный состав  $^{32}\text{P}$ -меченных фосфолипидов, образующихся в результате липидкиназной активности препаратов IgG из крови больных СКВ, не позволяет в настоящее время корректно их классифицировать. Поскольку ранее обнаружено, что, по крайней мере, часть липидов в препаратах sIgA может быть компонентом липопротеиновых комплексов молока [15], то не исключено, что и липиды, обнаруженные в препаратах IgG больных СКВ, имеют аналогичное происхождение.

Yu. Ya. Kit, V. A. Kovaleva, V. A. Richter

Phosphotransferase activity of IgG preparations from blood serum of humans with lupus erythromatosis pathology

Summary

This article evidences that phosphotransferase activity is associated with IgG fraction from blood serum of humans with lupus erythromatosis pathology. Polyclonal IgG (f. 1) was purified by sequential chromatography on protein-A-sepharose and DEAE-Fractogel. The IgG fraction (f. 2) possessing affinity to ATP was obtained by chromatography of f. 1 on ATP-sepharose. Phosphorylation of f. 1 and f. 2 in the presence of  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  caused the formation of  $^{32}\text{P}$ -labeled low-molecular-weight non-protein products detected by SDS-electrophoresis. These products contained  $^{32}\text{P}$ -labeled phospholipids which formed 6 fractions upon separation by the two-dimensional TLC. The IgG polypeptides phosphorylation was not observed. After removal of the lipids by gel-filtration in the buffer containing 5% dioxan, the phosphorylation of H- and L-chains of IgG has been detected. Addition of  $1\ \mu\text{M}$  ATP to the reaction medium containing  $0,018\ \mu\text{M}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , increased inclusion of  $^{32}\text{P}$  in the H-chain of IgG. We assume, that IgG-abzymes having phosphotransferase activity may be present in blood of humans with lupus erythromatosis pathology.

Ю. Я. Кит, В. А. Ковальова, В. А. Рихтер

Фосфотрансферазна активність препаратів IgG з сироватки крові хворих на системний червоний вовчак

Резюме

З сироватки крові хворих на системний червоний вовчак послідовними хроматографіями на колонках з протеїн-А-сефарозою та DEAE-сорбентом отримано електрофоретично гомогенний препарат IgG (препарат 1). З цього препарату хроматографією на колонці з АТР-сефарозою виділено фракцію IgG (препарат 2), яка мала спорідненість до АТР. При інкубуванні препаратів 1 і 2 з  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  спостерігалось утворення низькомолекулярних  $^{32}\text{P}$ -мічених продуктів. У складі останніх виявлено фосфоліпіди, які утворювали шість фракцій при розділенні двовимірною тонкошаровою хроматографією. За присутності ліпідів фосфорилування IgG у досліджуваних препаратах не виявлено. Після видалення ліпідів гел-фільтрацією в буфері, який містив 5% діоксану, відмічено фосфорилування Н- та L-ланцюгів IgG. Додавання до

реакційної суміші, що містила  $0,018\ \mu\text{M}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ,  $1\ \mu\text{M}$  «холодного» АТР збільшувало включення  $^{32}\text{P}$  у Н-ланцюги IgG.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Avrameas S. Natural autoantibodies: from «horror autotoxicus» to «gnothi seauton» // Immunol. Today.—1991.—12.—P. 154—159.
2. Mackay I. R. Autoimmunity: paradigms of Burnet and complexities of today // Immunol. Cell Biol.—1992.—70.—P. 159—171.
3. Dawson K. H., Bell D. A. Production and pathogenic effects of anti-DNA antibodies: relevants to antisense research // Antisense Res. Develop.—1991.—1.—P. 351—360.
4. Невинский Г. А., Канышкова Т. Г., Бунева В. Н. Природные каталитически активные антитела (абзимы) в норме и при патологии // Биохимия.—2000.—65.—С. 1473—1485.
5. Paul S. Mechanism and functional role of antibody catalysis // Appl. Biochem. and Biotechnol.—1998.—75.—P. 13—24.
6. Kozyr A. V., Kolesnikov A. V., Aleksandrova E. S. Novel functional activity of anti-DNA autoantibodies from sera of patients with lymphoproliferative and autoimmune diseases // Appl. Biochem. and Biotechnol.—1998.—75.—P. 45—61.
7. Канышкова Т. Г., Семенов Д. В., Власов А. В. ДНК- и РНК-гидролизующие антитела из молока человека и их возможная биологическая роль // Молекуляр. биология.—1997.—31.—С. 1082—1091.
8. Kit Yu. Ya., Mitrofanova E. E., Shestova O. E. Human secretory immunoglobulins A possess endonuclease activity and they are able to cause the destruction of nuclear chromatin *in vitro* // Укр. біохім. журн.—2000.—72.—С. 73—76.
9. Семенов Д. В., Канышкова Т. Г., Кит Ю. Я. Иммуноглобулины класса G молока человека гидролизуют нуклеотиды // Биохимия.—1998.—8.—С. 1097—1106.
10. Кит Ю. Я., Семенов Д. В., Невинский Г. А. Существуют ли каталитически активные антитела у здоровых людей? (Протеинкиназная активность sIgA из человеческого молока) // Молекуляр. биология.—1995.—29.—С. 893—905.
11. Кит Ю. Я., Шипицын М. В., Семенов Д. В. Фосфорилирование липидов, прочно связанных с секреторным иммуноглобулином А, в препаратах антител из молока человека, обладающих протеинкиназной активностью // Биохимия.—1998.—68.—С. 852—858.
12. Gorbunov D. V., Semenov D. V., Shipitsin M. V. Phosphorylation of minor lipids of human milk tightly bound to secretory immunoglobulin A // Rus. J. Immunol.—2000.—5.—P. 267—278.
13. Kit Y. Y., Semenov D. V., Nevinsky G. A. Phosphorylation of different human milk proteins by human catalytic secretory immunoglobulin A // Biochem. Mol. Biol. Int.—1996.—39.—P. 521—527.
14. Laemmli U. K. A cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T 4 // Nature.—1970.—227.—P. 2744—2750.
15. Кит Ю. Я., Семенов Д. В., Кулигина Е. В., Рихтер В. А. Влияние нуклеиновых кислот и полисахаридов на фосфотрансферазную активность препаратов секреторного иммуноглобулина А из молока человека // Биохимия.—2000.—65.—С. 237—243.
16. Levi D., Petasis N. A., Sherhan C. N. Polyisoprenyl phosphates in intracellular signaling // Nature.—1997.—389.—P. 985—989.

УДК 577.125

Надійшла до редакції 10.12.01