

Каталаза печінки щурів за умов штучного гіпобіозу

О. О. Гудкова, Н. В. Латишко, Л. В. Гудкова, В. О. Михайловський

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України
Вул. Леонтовича, 9, Київ, 01030, Україна
E-mail: gudl@biochem.kiev.ua

Досліджували особливості дії ферменту — антиоксиданта каталази в умовах гіпобіозу. У досліджах in vivo та in vitro виявлено активуючу дію $\text{HCO}_3^- \text{CO}_2$ на каталазу печінки щурів, яка відбувається у перші секунди реакції. Показано, що на фоні постійної концентрації вуглекислоти фермент залишається стабільним у межах рН 7,2—8,5. K_m каталази за норми і гіпобіозу є величинами одного порядку. Збільшення значення k_{cat} і k_{cat}/K_m ферменту під час гіпобіозу свідчить про зростання ефективності дії біокаталізатора за цих умов.

Ключові слова: каталаза, гіпобіоз, вуглекислота, поліаміни.

Вступ. У тварин, які перебувають в стані штучного гіпобіозу, мають місце значні зміни метаболічних процесів, активності ферментів, збільшення пулу природних антиоксидантів тощо. Ці зміни відбуваються за умов характерного для тварин, які гібернують, значного підвищення концентрації $\text{HCO}_3^- \text{CO}_2$ у тканинах і підсилюються в разі збільшення у печінці вмісту ендogenousного путресцину [1, 2]. Відомо також, що за умов гіпобіозу на фоні загального гальмування метаболізму не спостерігається гіпоксії і навіть має місце зростання рівня кисню у тканинах [4]. Одна з реактивних форм кисню — H_2O_2 є природним метаболітом у всіх організмів. Однак у надмірних концентраціях (більших за фізіологічні — 10^{-7} — 10^{-9} М) H_2O_2 окиснює різні біополімери і стає руйнівним, небезпечним метаболітом.

Каталаза є одним з основних ферментів антиоксидантної дії та ключовим ферментом утилізації H_2O_2 . Присутність ферменту майже в усіх живих організмах, консервативність у процесі еволюції та потужність каталітичної дії — кількість обертів на

декілька порядків вища, ніж у багатьох інших каталізаторів, — свідчить про надзвичайну важливість цього ферменту у виживанні організму. Відсутність каталази в останньому призводить до фатальних наслідків — накопичується H_2O_2 , руйнуються або модифікуються біологічні молекули, розпадаються клітинні структури, що спричинює загибель клітин. Навіть зниження присутності каталази в організмі до певного рівня є небезпечним і стає причиною розвитку деяких патологій. Це засвідчує значущість і актуальність дослідження згаданого ферменту за різних станів і особливо за умов гіпобіозу, де має місце порушення функціонування системи окисації—антиоксидації.

Мета цієї роботи полягала в дослідженні особливості дії каталази під впливом чинників гіпобіозу та участь каталази в антиоксидантному захисті тварин, які гібернують.

Матеріали і методи. Досліди проводили на білих безпородних щурах-самцях масою 180—250 г. У досліджах *in vivo* першу (контрольну) групу склали інтактні тварини (норма). Вони не підлягали ніяким впливам і їх утримували разом з дослідними щурами в умовах віварію.

Таблиця 1
Ефективність очищення каталази печінки щурів

Проба	Блок		Активність каталази			
	мг/г тканини печінки	%	од/мг білка	Ступінь очищення	Загальнв, од/мл гомогенату	%
Гомогенат печінки, n = 4	20,8±0,7	100	1398±83	1	28920	100
Очищена каталаза, n = 8	3,1±0,1	15	6233±638	4,47	19136	66

До другої групи входили тварини, котрих вводили в стан штучного гіпобіозу методом Бахметьєва-Анжус (модель закритої посудини) [3], поступово охолоджуючи у герметичній камері протягом 3 год при температурі зовнішнього середовища 3—5 °С. Ця модель відтворює певні зміни обміну речовин, які притаманні стану зимової сплячки [4, 5], і дозволяє використовувати в дослідах замість справжніх гетеротермів гомойотермних тварин [6], у даному випадку щурів.

Третю і четверту групи відповідно складали інтактні та гіпобіотичні тварини, у яких шляхом введення внутрішньочеревинно тіоацетаміду (ТАА) в розрахунку 20 мг на 100 г маси щурів ініціювали підвищений вміст ендogenous путресцину з 14 (норма) до 174 нмоль/г печінки [7].

Після декапітації печінку перфузували холодним розчином 0,15 М КСІ і гомогенізували у 4 об'ємах 0,007 М фосфатного буфера, рН 7,0, у присутності 0,005 М дитіотреїтола і 0,5 мМ ЕДТА. Досліджували активність ферменту за стану норми, штучного гіпобіозу, а також норми та гіпобіозу на фоні індукованого підвищеного вмісту ендogenous поліамінів.

У дослідах *in vitro* використовували безпосередньо путресцин у межах кінцевих концентрацій 9,5 нМ—0,6 мМ і 0,18 М бікарбонатний буфер, величину рН якого доводили до 7,4 за рахунок насичення CO₂. Різні концентрації бікарбонату у дослідних пробах отримували за допомогою згаданого бікарбонатного буфера.

Виділення та очищення ферменту з одержаного гомогенату печінки. З даних літератури відомо про гідрофобні властивості каталази печінки щурів, які забезпечують стабільність ферменту в суміші етанол—хлороформ. Цей факт ми використали, обираючи метод очищення даної каталази. Каталазу печінки виділяли і очищували за схемою: до 1 мл одержаного гомогенату на холод (4 °С) поетапно додавали і перемішували протягом 5 хв 0,3 мл етанолу, 0,15 мл хлороформу і 300 мг

KH₂PO₄. Центрифугували протягом 30 хв при 20000 g і температурі 4 °С. Щільні осадки рожевого кольору відкидали. Надосадову рідину (прозора, світло-жовтого кольору) діалізували проти 0,01 М фосфатного буфера, рН 7,5, при 4 °С.

Визначення активності каталази здійснювали двома методами. Метод йодомеричного титрування Ейлера-Джозефсона [8] у модифікації Левіної та Лебедевої [9] заснований на визначенні кількості пероксиду водню, який розщеплено за фіксований проміжок часу під дією даної кількості ферменту за стандартних умов (0,01 М розчин H₂O₂ в 0,006 М фосфатному буфері, рН 6,8, температура 4 °С). До 0,5 мл розведеного ферменту додавали 5 мл розчину H₂O₂ і через 3 хв реакцію зупиняли додаванням 2 мл 20 %-го H₂SO₄. До кожної проби приливали 2 мл 10 %-го KI, 2—3 краплини 1 %-го (NH₄)₂MoO₄ і через 3 хв титрували вільний йод, який виділився, 0,01 N гіпосульфитом, використовуючи крохмаль як індикатор.

Контрольна проба замість ферменту містила 0,5 мл дистильованої води.

За одиницю активності каталази прийнято кількість ферменту, яка каталізує розщеплення 1 мкмоль H₂O₂ за 1 хв у даних умовах.

Спектрофотометричний метод [10]: у кварcovій кюветі при температурі 25 °С змішували 0,1 мл розведеного розчину ферменту і 2,9 мл 0,01 М розчину H₂O₂ в 0,05 М фосфатному буфері, рН 7,0, і фіксували проміжок часу, за який відбувається зниження A₂₄₀ від 0,450 до 0,400. Це відповідає розщепленню 3,45 мкмоль H₂O₂ у 3 мл проби. Активність каталази виражали в мкмольях розщепленого H₂O₂ за 1 хв.

Вміст білка визначали за Лоурі [11] та в біуретовій реакції — за методом [12].

Результати і обговорення. Досліди розпочато з виділення і очищення каталази печінки щурів. Отримані дані представлено в табл. 1.

Видно, що запропонована схема очищення

Таблиця 2
Активність каталази печінки щурів за різних станів організму* ($M \pm m$)

Стан	<i>in vivo</i> (n = 12)		<i>in vitro</i> (n = 6)	
	од/г печінки	%	од/г печінки	%
Норма	13374 ± 899	100	20840 ± 56	100
Гіпобіоз (HCO ₃ ⁻ -CO ₂)	19418 ± 696	145**	27251 ± 121	131**
Норма + путресцин	12894 ± 1984	97	20424 ± 361	99
Гіпобіоз + путресцин	13467 ± 1154	101	24087 ± 28	115

*Концентрація HCO₃⁻-CO₂ *in vitro* становила 0,18 М, путресцину — 333 нМ; **значення, статистично відмінні від норми за t-критерієм Ст'юдента з достовірністю $p < 0,001$.

дозволяє відокремити 85 % баластних білків. 15 % білка, які залишилися, містять 66 % активності каталази. Існують дві можливі причини втрати 34 % активності каталази при очищенні: 1) з баластними білками відокремилася і частина білка каталази; 2) при очищенні має місце зниження стабільності ферменту. Питома активність каталази після очищення збільшилася у 4,5 рази і була в межах 6200—26000 од/мг білка залежно від використаних тварин і сезону року, що відповідає даним літератури.

Значні розбіжності у величинах питомої активності каталази печінки щурів (0,122—30000 од/мг білка), за даними різних авторів, пов'язані також із застосуванням різних методів очищення та визначення активності ферменту [10, 13—15]. Тому так важливо при порівняльних дослідженнях суворо додержуватися ідентичних умов проведення експерименту.

За умов гіпобіозу вміст сумарного білка в печінці зменшується на 20—25 %. Однак відомо, що активність каталази у цих же умовах зростає (табл. 2, 4). Можна припустити, що згадане зменшення вмісту білка відбувається не за рахунок білка каталази.

На наступному етапі вивчали особливості каталітичної дії каталази за гіпобіозу і підвищеного рівня путресцину порівняно з нормою. Каталаза розщеплює пероксид водню з утворенням води і кисню. Отже, функція цього ферменту полягає не лише у знешкодженні токсичного для клітини метаболіту, що забезпечує ензиматичний антиоксидантний захист організму, але й у підтриманні при цьому певного рівня оксигенації тканин.

При вивченні особливостей дії ферменту каталази за умов гіпобіозу в дослідях *in vivo* було показано, що в печінці гіпобіотичних щурів актив-

ність каталази зростає до 45 % (табл. 2). Дані табл. 2 свідчать також про корекцію активності ферменту путресцином.

Як відомо, регуляторним фактором метаболічної адаптації в умовах гіпобіозу може виступати вуглекислота у вигляді різних метаболічних форм [1]. Тому на наступному етапі досліджували вплив вуглекислоти на дію ферменту в дослідях *in vitro* з використанням гомогенатів печінки безпородних білих щурів.

Першу серію дослідів *in vitro* присвячено вивченню залежності активності каталази від концентрації вуглекислоти у діапазоні концентрації від 0 до 107 мМ. З наведених на рис. 1 даних видно, що вуглекислота в концентрації від 3 до 18 мМ (30 хв інкубації) не впливає на активність каталази, а починаючи з 35—40 мМ — збільшує активність ферменту на 30 %.

У другій серії дослідів досліджували динаміку зміни активності каталази під впливом HCO₃⁻-CO₂. Показано, що активація каталази відбувається в перші секунди реакції, а від 30 с і до 30 хв інкубації ферменту з вуглекислотою рівень активності не змінюється (рис. 2).

У дослідях третьої серії досліджено залежність активності каталази від рН у діапазоні величин 6,9—8,5 на фоні постійної концентрації вуглекислоти (107 мМ). Результати, представлені на рис. 3, свідчать про те, що фермент стабільний у діапазоні рН 7,2—8,5 і його активність незначно знижується при рН 6,9—7,0.

Встановлено, що поліаміни та ключовий фермент їхнього обміну — орнітиндекарбоксилаза — відіграють важливу роль у метаболічному забезпеченні адаптивних змін гомеостазу за умов гіпобіозу [16]. Зважаючи на те, що збільшення вмісту ендogenous путресцину призводить до майже повного

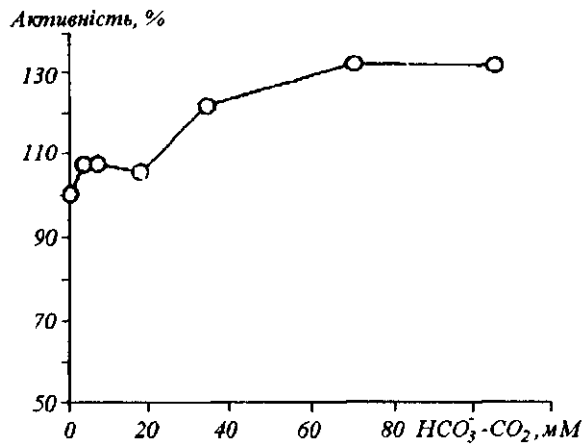


Рис. 1. Вплив різних концентрацій $\text{HCO}_3^- \text{-CO}_2$ на активність каталази печінки щурів

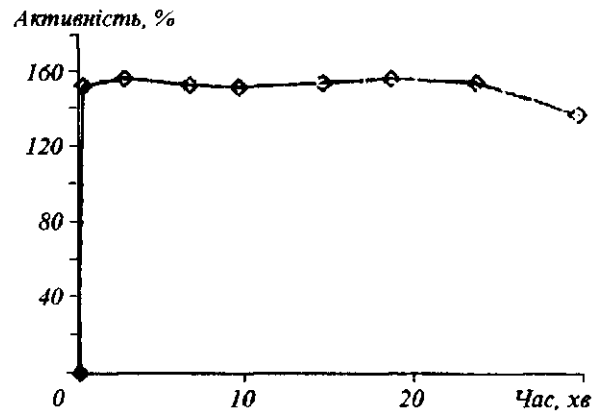


Рис. 2. Динаміка впливу $\text{HCO}_3^- \text{-CO}_2$ на активність каталази печінки щурів

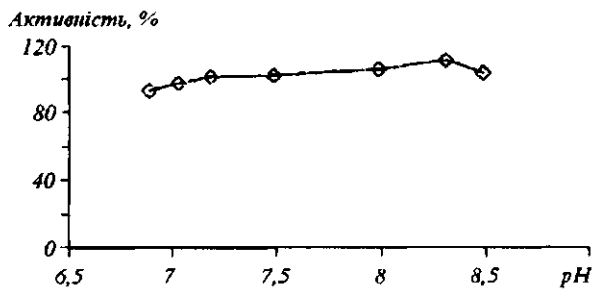


Рис. 3. Активність каталази печінки щурів при різних значеннях pH

пригнічення вільнорадикального окиснення в умовах гіпобіозу [2], було доцільним вивчити вплив цієї сполуки на активність каталази *in vitro*. Тому наступну серію дослідів *in vitro* присвятили аналізу впливу путресцину на активність каталази як у присутності вуглекислоти (107 мМ), так і без неї.

Показано незначний ефект путресцину в досліджених концентраціях на активність каталази. Вуглекислота дещо стабілізує активність каталази за присутності путресцину (табл. 3). Це узгоджується з дослідями *in vivo* (табл. 2), де показано, що підвищений вміст поліамінів у печінці за гіпобіозу забезпечує функціонування каталази на рівні норми.

Таким чином, в усіх дослідях *in vivo* та *in vitro* вперше показано, що вуглекислота суттєво збільшує каталітичну активність каталази за умов гіпобіозу. Причому дія цього метаболіту проявляється з перших секунд реакції. Надалі за допомогою кінетичних методів з'ясовували механізми спостережених явищ. У дослідях *in vivo* ми вивчали залежність початкових швидкостей реакції розщеплення пероксиду водню очищеною з печінки щурів

каталазою за різних модельних станів організму — норма, штучний гіпобіоз (гіперкапнія) і підвищений вміст поліамінів (який у дослідях *in vivo* забезпечували опосередковано — індукцією їхнього синтезу після дії тіоацетаміду на орнітиндекарбоксілазу) на фоні нормального і гіпобіотичного станів.

Встановлено, що за всіх вищезгаданих модельних станів фермент печінки щурів виявляє кінетику насичення. Характер кінетичних кривих — рівнобічні гіперболи, які добре лінеаризуються в координатах Лайнуївера-Берка (рис. 4), свідчить про підпорядкованість каталазної реакції ферменту рівнянню Міхаеліса-Ментен. За високих концентрацій H_2O_2 (0,6 М) спостерігається зниження каталазної активності (тобто проявляється субстратне пригнічення швидкостей реакції). Це відомий факт для каталази з різних джерел, оскільки вона належить до так званих ферментів-самовбивць (суїцидних). З цієї причини використана нами гранична концентрація H_2O_2 становила 0,9 М. Отримано величину K_M для всіх досліджених станів у межах 0,1—0,2 М, яка є близькою до значення K_M інших типових каталаз, у тому числі каталаз тваринного походження [17]. Проте зареєстровано і деякі відмінності у каталітичних властивостях каталази з печінки. А саме: при майже незмінному значенні K_M за різних модельних станів спостерігалось статистично достовірне збільшення каталітичної активності, числа обертів (k_{cat}) і каталітичної ефективності (k_{cat}/K_M) для каталази печінки щурів лише за гіпобіотичного стану (табл. 4).

Виходячи з цього ми припустили існування розбіжностей у функціонуванні каталази в печінці

Таблиця 3
Вплив путресцину на активність каталази печінки шурів *in vitro*

Концентрація путресцину, нМ	n	Активність	
		од/г печінки	%
0	6	22644 ± 144	100
0 + HCO ₃ ⁻	3	25946 ± 251	115
9,52	3	20840 ± 56	100
9,52 + HCO ₃ ⁻	6	27251 ± 131	131
26,7	3	20258 ± 100	100
26,7 + HCO ₃ ⁻	6	24004 ± 73	119
44,4	3	20424 ± 361	100
44,4 + HCO ₃ ⁻	6	24087 ± 28	118
133,3	6	20230 ± 96	100
133,3 + HCO ₃ ⁻	6	23671 ± 169	117
667	3	20063 ± 240	100
667 + HCO ₃ ⁻	6	23005 ± 169	115
667 · 10 ³	3	19758 ± 734	100
667 · 10 ³ + HCO ₃ ⁻	6	24642 ± 48	125

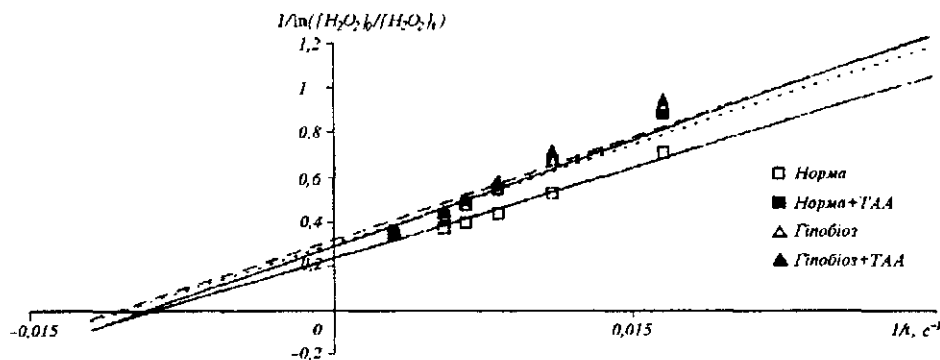


Рис. 4. Анаморфози кінетичних кривих розщеплення 80 мМ Н₂О₂ каталазою печінки шурів за різних модельних станів організму в координатах 1/ln([H₂O₂]₀/[H₂O₂]_t) - 1/t

за умов норми і гіпобіозу. Можливо, що фактором, який впливає на процес каталітичного розщеплення Н₂О₂ каталазою за умов гіпобіозу, є такий чинник, як НСО₃⁻-СО₂.

Це припущення перевіряли в дослідах *in vitro*. Дійсно, показано залежність початкових швидкостей розщеплення Н₂О₂ каталазою з печінки шурів від концентрації бікарбонату за різних початкових концентрацій пероксиду водню (рис. 5). Тобто НСО₃⁻-СО₂ позитивно впливає на активність ферменту і його ефект підсилюється із збільшенням концентрації вуглекислоти.

У той же час показано, що путресцин у дослідженій концентрації (333,3 нМ) майже не впливає на активність каталази печінки ні за стану норми, ні за стану гіпобіозу (рис. 6), що узгоджується з попередніми даними.

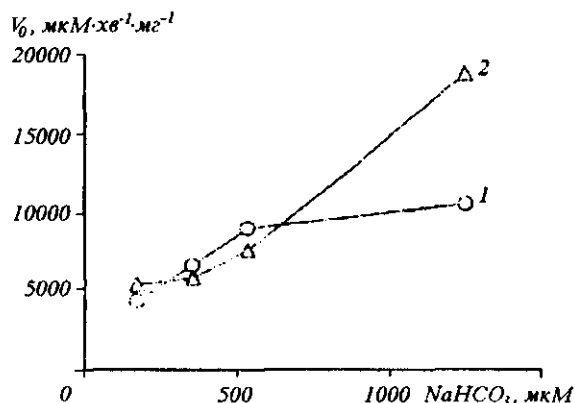
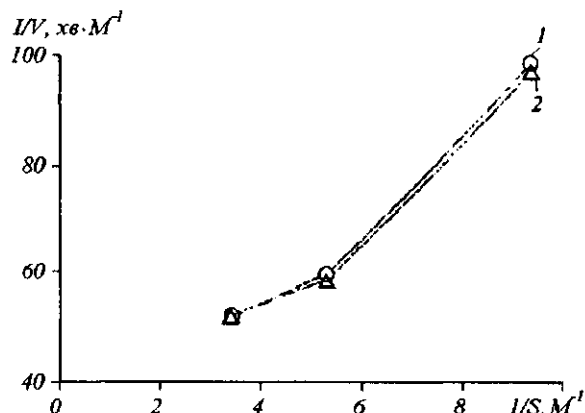
Отже, встановлено зростання питомої активності каталази печінки за умов гіпобіозу (табл. 2—4), яке здійснюється завдяки підвищеному вмісту НСО₃⁻-СО₂ у тварин [4]. Це спричинює збільшення антиоксидантного потенціалу клітини і певною мірою пояснює виявлений раніше феномен пригнічення вільнорадикального окислення у гібернаючих тварин [2]. Кінетичні дослідження свідчать, що активація ферменту пов'язана не з ініціацією його синтезу, а із зростанням ефективності дії біокаталізатора.

Отримані дані дозволяють також припустити наявність певних розбіжностей у механізмах функціонування каталази печінки за умов норми і гіпобіозу. Не виключено, що зростання каталітичної активності каталази за дії чинників гібернації пов'язано з переключенням ферменту з пе-

Таблиця 4

Каталітичні та кінетичні параметри каталази печінки щурів за різних станів організму ($M \pm m$) ($n = 11$)

Стан	Питома активність		K_M, M	k_{cat}, c^{-1}	$k_{cat}/K_M, M^{-1} \cdot c^{-1}$
	од./мг білка	%			
Норма	26545 ± 949	100	0,20 ± 0,009	5755 ± 244	28894 ± 2396
Гіпобіоз	33115 ± 613	125	0,16 ± 0,018	6669 ± 243	49626 ± 7424
Норма + ТАА	23421 ± 1030	89	0,15 ± 0,006	3527 ± 169	23722 ± 870
Гіпобіоз + ТАА	23987 ± 462	91	0,13 ± 0,002	2554 ± 239	20848 ± 1813

Значення статистично відмінні від норми за t -критерієм Ст'юдента з достовірністю * $p < 0,001$, ** $0,02 < p < 0,05$.Рис. 5. Залежність початкових швидкостей розщеплення H_2O_2 каталази печінки щурів від концентрації бікарбонату за різних початкових концентрацій перексиду: 1 — H_2O_2 , 20 мМ; 2 — H_2O_2 , 27 мМРис. 6. Вплив путресцину на швидкість розщеплення H_2O_2 каталазою печінки щурів за станів норми та гіпобіозу: 1 — норма; 2 — гіпобіоз

роксидазного типу реакції на каталазний, тобто з утворенням молекулярного кисню. Згідно з раніше отриманими даними [4] за умов штучного гіпобіозу, всупереч очікуванням, не спостерігається тканинної гіпоксії і забезпечується нормальний (навіть дещо підвищений) рівень оксигенації. Цілком імовірно, що кисневий гомеостаз підтримується за участі саме каталази, яка при цьому активується $HCO_3^-CO_2$.

O. O. Gudkova, N. V. Latyshko, L. V. Gudkova, V. O. Mikhailovsky

Rat liver catalase under artificial hypobiosis conditions

Summary

The peculiarities of antioxidant enzyme catalase action in hypernatation were studied. *In vivo* and *in vitro* assays show that $(HCO_3^-CO_2)$ activates rat liver catalase. It was determined that between pH 7.2 and 8.5 the enzyme was stable when the carbon concentration was constant. The catalase K_M values at norm and hypobiosis are of the same level. Nevertheless, the enzyme k_{cat} and k_{cat}/K_M values rise was established under the hypobiosis conditions. This increase relates to a greater biocatalyst efficiency rather than to a higher level of its synthesis.

Key words: catalase, hypobiosis, carbon dioxide, polyamines.

O. A. Gudkova, N. V. Latyshko, L. V. Gudkova, V. O. Mikhailovsky

Каталаза печени крыс в условиях искусственного гипобіоза

Резюме

Исследовали особенности действия фермента — антиоксиданта каталазы при гипобіозе. В опытах *in vivo* и *in vitro* установлено активизирующее действие $HCO_3^-CO_2$ на каталазу печени крыс. Показано, что на фоне постоянной концентрации углекислоты фермент стабилен в пределах pH 7,2-8,5. K_M каталазы в условиях нормы и гипобіоза являются величинами одного порядка. В то же время выявлено увеличение k_{cat} и k_{cat}/K_M фермента при гипобіозе, что свидетельствует о росте эффективности действия биокатализатора в этих условиях.

Ключевые слова: каталаза, гипобіоз, углекислота, полиамины.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Мельничук Д. О., Михайловський В. О., Мельничук С. Д. Механізми метаболічної адаптації // Укр. біохім. журн.— 2000.— 72, № 4—5.— С. 70—80.
2. Kuzmenko A. I., Mikhailovsky V. O. Free-radical lipid oxidation at the deep hypothermid and amiles action // Int. Congr. «Stress and adaptation from molecules to man» (Budapest, 1—5 July 1997).—Budapest, 1997.—P. 86

3. *Andjus R. K., Smith A. U.* Reanimation of adult rats from body temperatures between 0 and +2 °C // *J. Physiol.*—1956.—128, N 3.—P. 446—472.
4. *Мельничук С. Д., Роговський С. П., Мельничук Д. О.* Особливості кислотнолужної рівноваги та азотого обміну в організмі шурів за умов штучного гіпобіозу // *Укр. біохім. журн.*—1995.—67, № 4.—С. 67—75.
5. *Игнатьев Д. А., Колаева С. Г., Крамарова Л. И., Кравченко И. И.* Гипотермическое влияние на мышечной фракции 1—10 кД тонкой кишки гибернующего суслика в условиях гипоксии и гиперкапнии // *Журн. эволюцион. биохимии и физиологии.*—1989.—35, № 3.—С. 318—324.
6. *Тимофеев Н. Н.* Искусственный гипобіоз.—М.: Медицина, 1983.—192 с.
7. *Михайловский В. О.* Особенности регуляции орнитин-декарбоксилазы при экстремальных состояниях // *Материалы 5-го Всесоюз. симпоз. по мед. энзимологии.*—Махачкала, 1986.—С. 76.
8. *Самнер О. Б.* Химия ферментов и методы их исследования.—М., 1948.—250 с.
9. *Лебедева Е. И., Левина Л. Ш.* Определение активности фермента каталазы: научно-техническая информация.—М.: ЦИНТИПИЩЕПРОМ, 1965.—Вып. 4.—6 с.
10. *SIGMA, Biochemicals and Reagents.*—New York, 1999.—229 p.
11. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. L.* Protein measurement with the folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.*—1951.—193, N 1.—P. 256—275.
12. *Филипович Ю. Б., Егорова Т. А., Севастьянова Т. А.* Количественное определение белка по биуретовой реакции // *Практ. по общ. биохимии.*—М., 1982.—268 с.
13. *Price V. E., Sterling W. R., Tarantola V. A., Hartley R. W., Jr., Rechcigl M., Jr.* The kinetics of catalase synthesis and destruction *in vivo* // *J. Biol. Chem.*—1962.—237, N 11.—P. 3468—3475.
14. *Корольок М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е.* Метод определения активности каталазы // *Лаб. дело.*—1988.—№ 1.—С. 16—19.
15. *Смирнов А. В., Криворучко Б. И., Зарубина И. В., Мирнова О. П.* Защитные эффекты триметазина при острой гипоксии // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.*—1998.—25.—С. 410—412.
16. *Михайловский В. О.* Адаптивное регулирование обмена полиаминов у животных в условиях естественного и искусственного охлаждения // *Тез. доп. 1-го з'їзду Укр. тов-ва кріобіології і кріомедицини.*—Харків, 1995.—С. 170—171.
17. *Латышко Н. В., Гудкова Л. В.* Кинетические и каталитические свойства каталазы *Penicillium vitale* // *Укр. біохім. журн.*—1996.—68, № 2.—С. 69—73.

УДК 577.152.111:577.322.54
Надійшла до редакції 05.11.03