

ВПЛИВ ЛІПОСОМНОГО ПРОТИПУХЛИННОГО ПРЕПАРАТУ ГІДРОБРОМІД 5-(5',6'-БЕНЗКУМАРОЇЛ-3')-МЕТИЛАМІНОУРАЦИЛУ НА ЦИТОХРОМ P-450 У МІКРОСОМНІЙ ФРАКЦІЇ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ-ПУХЛИНОНОСІЇВ

М. М. МАРЧЕНКО, Г. П. КОПИЛЬЧУК, О. В. КЕЦА, І. О. ШМАРАКОВ

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, Україна;
e-mail: ketsa80@mail.ru

Вивчено швидкість теплової інактивації цитохрому P-450, вміст білкових сульфгідрильних груп і цитохрому P-450 у мікросомній фракції печінки щурів у різні фази росту карциноми Герена в організмі, а також за дії на організм протипухлинного хімічного препарату гідробромід 5-(5',6'-бензкумароїл-3')-метиламіноурацилу (БКУ) в ліпосомній і неліпосомній формах. Ліпосомну форму БКУ вводили через 2 години після введення суспензії фосфатидилхолінових ліпосом. Показано, що процес росту в організмі карциноми Герена супроводжується зниженням вмісту цитохрому P-450 і білкових SH-груп у мікросомній фракції печінки щурів, а також підвищенням швидкості переходу мікросомного цитохрому P-450 в його неактивну форму P-420. Дослідження стійкості цитохрому P-450 показало, що ефективність протипухлинного ліпосомного засобу БКУ значно перевищує ефективність дії його неінкапсульованої форми в щурів-пухлиноносіїв на кінцевих етапах розвитку новоутворення. Попереднє введення фосфатидилхолінових ліпосом перед введенням ліпосомної форми БКУ сприяє наближенню досліджуваних показників до рівня контролю у стаціонарній фазі росту карциноми Герена.

Ключові слова: інактивація цитохрому P-450, мікросомна фракція, сульфгідрильні групи білків, ліпосомний протипухлинний препарат гідробромід 5-(5',6'-бензкумароїл-3')-метиламіноурацилу, печінка, карцинома Герена.

Монооксигеназна система, до складу якої входять цитохроми P-450 та b_5 , NADPH- і NADH-редуктази, є виключно різноманітною групою ферментів, враховуючи безліч субстратів для їхньої дії та типів реакцій, які вони здійснюють. Із всіх її компонентів лише цитохром P-450 (неспецифічна монооксигеназа) здатна активувати молекулярний кисень за участю електронів, донором яких є NADPH і b_5 [1]. Важливим фактором функціонування монооксигеназної системи печінки є стійкість у них цитохрому P-450 до різних пошкоджуючих факторів, у тому числі до розвитку новоутворень в організмі [2]. Маловивченими залишаються механізми інактивації мікросомного цитохрому P-450 печінки у разі розвитку в організмі злоякісного новоутворення, а також за дії на організм протипухлинного препарату кумаринового похідного гідробромід 5-(5',6'-бензкумароїл-3')-метиламіноурацилу (БКУ) в ліпосомній та неліпосомній формах.

Метою роботи було вивчити вплив фосфоліпідної терапії та протипухлинного хімічного препарату БКУ в ліпосомній та неліпосомній формах на вміст і швидкість інактивації

ключового ферменту монооксигеназної системи – цитохрому P-450 у мікросомній фракції печінки щурів з перещепленою карциномою Герена, а також можливої ролі в цих процесах вільних радикалів.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на білих безпородних щурах-самицях з масою тіла 130–150 г. Тварин було поділено на групи: I – інтактні тварини; II – щури, яким трансплантували карциному Герена за попередньо опрацьованою методикою [3]; III – щури-пухлиноносії, яким вводили суспензію фосфатидилхолінових ліпосом за дві години до введення ліпосомного БКУ; IV, V – щури-пухлиноносії, яким вводили відповідно ліпосомну або неліпосомну форми БКУ. Евтаназію дослідних тварин проводили під легким ефірним наркозом на 7, 14 та 21-у добу після трансплантації пухлини.

Суспензію фосфатидилхолінових ліпосом, БКУ та його ліпосомну форму вводили per os щоденно, починаючи з 7-го дня після перививання пухлини із розрахунку 6 мг БКУ та 100 мг фосфоліпиду на 1 кг маси тіла щурів. Бішарові ліпосоми одержували за методом [4],

що передбачає ультразвукове оброблення (44 кГц, 20–30 мкА) яєчного фосфатидилхоліну і холестеролу (молярне співвідношення 9 : 2). Ліпосомний протипухлинний засіб БКУ одержували запропонованим нами методом [5] за молярного співвідношення фосфатидилхолін : холестерол = 7 : 3.

Протипухлинний ефект БКУ в ліпосомній і неліпосомній формах оцінювали за ступенем гальмування росту пухлини (Г %) на 7, 10, 14, 17, 21, 26 дні експерименту і збільшенням тривалості життя (ЗТЖ) порівняно з інтактними тваринами. Об'єм пухлини визначали за формулою $V = 0,4 ab^2$, де a – більший діаметр пухлини, b – менший діаметр пухлини [6].

Мікросомну фракцію виділяли з печінки щурів методом диференційного центрифугування [7]. Вміст цитохрому *P*-450 визначали спектрофотометричним методом Т. Omura і R. Sato [8], використовуючи коефіцієнт поглинання $91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Теплову інактивацію мікросомного цитохрому *P*-450 визначали шляхом реєстрації диференційних спектрів поглинання його відновлених карбоксикомплексів при 37°C протягом 21 хв після пропускання через дослідну кювету оксиду вуглецю (II) з наступним додаванням дитіоніту натрію в дослідну і контрольну проби [9]. Швидкість інактивації розраховували за різницею оптичного поглинання при довжині хвиль 420 і 450 нм ($\Delta A_{420-450}$)

на 1 нмоль цитохрому *P*-450 за 1 хв [10]. Вміст білкових сульфгідрильних груп (SH-груп) визначали методом М. Е. Murphy та ін. [11] з використанням реагенту Елмана. Кількість сульфгідрильних груп білків обчислювали з урахуванням коефіцієнта поглинання при 412 нм $11,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ і виражали в нмоль/мг мікросомного білка. Вміст білка визначали за методом Лоурі [12]. Одержані результати обробляли методом варіаційної статистики з використанням *t*-критерію Стьюдента.

У роботі використовували реактиви: трис, натрій дитіоніт («Merck», Німеччина), альбумін («Reanal», Угорщина), холестерол («Симбіас», Росія), інші реактиви вітчизняного виробництва марки ч.д.а.

Результати та обговорення

Результати проведених досліджень показали, що у процесі росту карциноми Герена в організмі щурів в їхній печінці відбуваються значні зміни вмісту та швидкості теплової інактивації цитохрому *P*-450. Так, на стадії початкового та інтенсивного росту пухлини в мікросомній фракції не лише знижується вміст цитохрому *P*-450, але й підвищується швидкість його інактивації порівняно з нормою (рис. 1, 2). На термінальних етапах різниця стає ще більш значною (рис. 1). Імовірно, що продукти метаболізму пухлини в період її

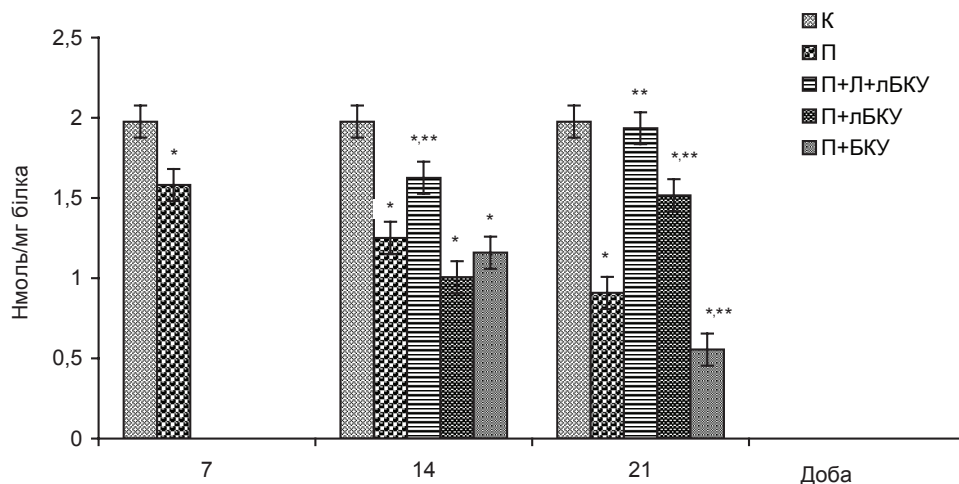


Рис. 1. Вміст цитохрому *P*-450 у мікросомній фракції печінки щурів-пухлиноносіїв за дії гідробромід 5-(5',6'-бензкумароїл-3')-метиламіноурацилу в ліпосомній і неліпосомній формах. Тут і на рис. 4: К – інтактні тварини; П – тварини-пухлиноносії; П+Л+lBКУ – тварини-пухлиноносії, яким вводили суспензію фосфатидилхолінових ліпосом, а через дві години ліпосомний гідробромід 5-(5',6'-бензкумароїл-3')-метиламіноурацилу; П+lBКУ – тварини-пухлиноносії, яким вводили ліпосомний гідробромід 5-(5',6'-бензкумароїл-3')-метиламіноурацилу; П+BКУ – щури-пухлиноносії, яким вводили гідробромід 5-(5',6'-бензкумароїл-3')-метиламіноурацилу в неліпосомній формі; * статистично вірогідна різниця порівняно з інтактними тваринами, $p \leq 0,05$; ** статистично вірогідна різниця порівняно з групою щурів-пухлиноносіїв, $p \leq 0,05$.

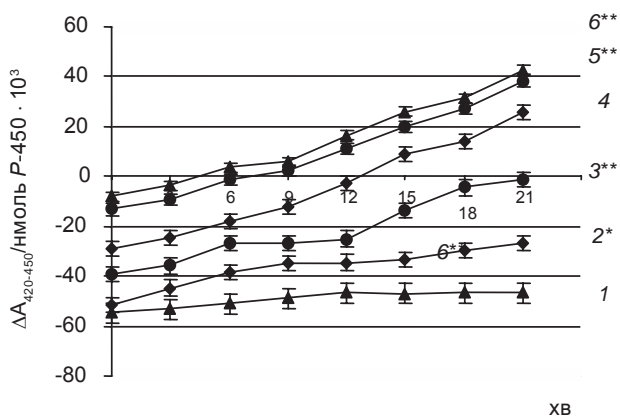


Рис. 2. Швидкість інактивації цитохрому P-450 у мікросомній фракції печінки щурів-пухлиноносіїв у логарифмічну фазу росту новоутворення: 1 – інтактні тварини; 2,4 – щури-пухлиноносії на 7-у та 14-у добу після трансплантації пухлини відповідно; 5,6 – щури-пухлиноносії, яким вводили ліпосомний та неліпосомний гідробромід 5-(5',6'-бензкумароїл-3')-метиламіноурацилу відповідно; 3 – щури-пухлиноносії, яким вводили суспензію фосфатидилхолінових ліпосом, а через 2 год ліпосомний гідробромід 5-(5',6'-бензкумароїл-3')-метиламіноурацилу; * статистично достовірна різниця порівняно з інтактними тваринами, $p \leq 0,05$; ** статистично вірогідна різниця порівняно з групою щурів-пухлиноносіїв, $p \leq 0,05$.

інтенсивного росту, потрапляючи в печінку, як основний гомеостатичний орган організму, призводять до порушення мембран ендоплазматичного ретикулума, що сприяє підвищенню швидкості переходу цитохрому P-450 в його неактивну форму P-420. Щоб зрозуміти, чи є така інактивація наслідком дії вільних радикалів, нами було досліджено вміст білкових сульфгідрильних груп у мікросомній фракції печінки, окислення яких переважно зумовлюється вільними радикалами, в тому числі й активними формами кисню, які утворюються безпосередньо в активному центрі саме цитохрому P-450 [13]. Так, процес розвитку в організмі карциноми Герена супроводжується поступовим окисленням SH-груп білків мікросомної фракції печінки щурів, яке найбільше виражено в термінальну фазу росту карциноми Герена, коли досліджуваний показник знижується в 3,2 раза порівняно з інтактними тваринами (рис. 4). Така висока кореляція між процесом інактивації цитохрому P-450, його вмістом та окисленням сульфгідрильних груп білків у мікросомній фракції свідчить про єдиний механізм їх виникнення [14].

Нами було досліджено вплив хімічного засобу гідробромід 5-(5',6'-бензкумароїл-3')-метиламіноурацилу з протипухлинною активністю, базуючись на тому, що метаболізм похідних кумарину здійснюється деякими ізоформами цитохрому P-450 родини 2 (CYP 2) [15, 16]. Відомо [17], що ліпосоми відіграють роль "контейнерів" для постачання протипухлинних засобів до тканини новоутворення, тому ми застосували ліпосомну форму БКУ (лБКУ), яка може потрапляти безпосередньо в пухлину і знижувати токсичну дію хімічного засобу на печінку.

Попередньо проведений аналіз показників протипухлинної активності досліджуваних сполук показав, що найбільшу активність виявляє ліпосомна форма БКУ. Протипухлинна дія лБКУ кількісно і якісно переважає цитостатичну дію неінкапсульованого БКУ, що виражається вищими показниками гальмування росту пухлини і збільшенням на 52% тривалості життя експериментальних тварин (таблиця).

Встановлено, що семиденне введення БКУ, як у ліпосомній, так і неліпосомній формах, не призводить до вірогідних змін у вмісті цитохрому P-450 порівняно з нелікованими щурами-пухлиноносіями (рис. 1), що може бути пов'язано з посиленням синтезом ферменту першої фази детоксикації у клітині у відповідь на введення кумаринового похідного для усунення дисбалансу в монооксигеназній системі. Однак дія вищезазначених засобів підвищує як швидкість інактивації (рис. 2), так і окислення білкових сульфгідрильних груп (рис. 4) у період інтенсивного росту пухлини порівняно з дослідним контролем. Імовірно, що БКУ в неліпосомній і частково в ліпосомній формах потрапляє в печінку, де проявляє свої прооксидантні властивості і може спричинювати певні деструктивні зміни мембранних структур, які сприяють підвищенню швидкості теплової інактивації цитохрому P-450.

На термінальних етапах розвитку пухлини визначається різниця в дії зазначених засобів. Так, введення неінкапсульованого БКУ призводить до підвищення швидкості переходу цитохрому P-450 в цитохром P-420 (рис. 3), який є чутливішим до дії протеаз, знижує вміст цитохрому P-450 в 1,6 раза (рис. 1) та підвищує окислення білкових SH-груп у 2,2 раза (рис. 4) в мікросомній фракції печінки порівняно з контрольними щурами-пухлиноносіями. Це може бути пов'язано з раніше встановленим нами фактом активації процесів ліпопероксидації в мікросомній фракції печінки за дії

Противухлинна активність різних форм хімічного засобу гідробромід 5-(5',6'-бензкумароїл-3')-метиламіноурацилу

Препарат	Доза, мг/кг	Гальмування росту пухлини, %, через дні:					Збільшення тривалості життя, %	Загибель від токсичності, %	Регресія пухлини, %
		10	14	17	21	26			
БКУ	6	29	30	31	30	28	19	0	10
лБКУ	6	37	38	62	74	89	71	0	50

Примітка: БКУ – гідробромід 5-(5',6'-бензкумароїл-3')-метиламіноурацилу, лБКУ – ліпосомний засіб гідробромід 5-(5',6' -бензкумароїл-3')-метиламіноурацилу.

даного хімічного засобу [18]. Слід зазначити той факт, що за дії неліпосомної форми БКУ в мікросомній фракції різко інтенсифікується утворення продуктів пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ), тоді як деструкція цитохрому P-450 не є істотною, що свідчить на користь тригерного механізму ПОЛ у руйнуванні цитохрому P-450: не вся інтенсивність процесу ПОЛ використовується в цьому разі [19].

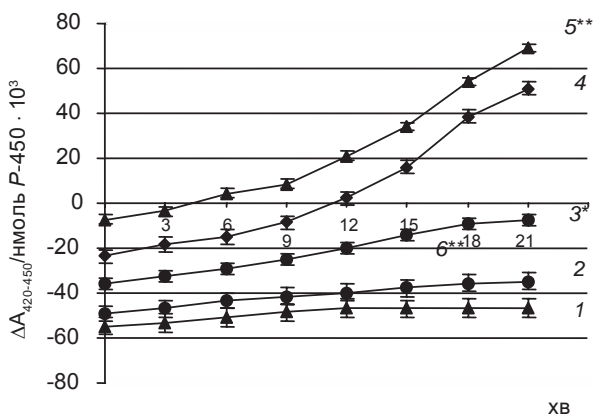


Рис. 3. Швидкість інактивації цитохрому P-450 у мікросомній фракції печінки щурів-пухлиноносіїв у стаціонарну фазу росту новоутворення: 1 – інтактні тварини; 2 – щури-пухлиноносії, яким вводили суспензію фосфатидилхолінових ліпосом, а через 2 год ліпосомний засіб гідробромід 5-(5',6'-бензкумароїл-3')-метиламіноурацилу; 3 – щури-пухлиноносії, яким вводили ліпосомний засіб гідробромід 5-(5',6'-бензкумароїл-3')-метиламіноурацилу; 4 – щури-пухлиноносії на 21-у добу росту новоутворення в організмі; 5 – щури-пухлиноносії, яким вводили гідробромід 5-(5',6'-бензкумароїл-3')-метиламіноурацилу в неліпосомній формі; * статистично достовірна різниця порівняно з інтактними тваринами, $p \leq 0,05$; ** статистично достовірна різниця порівняно з групою щурів-пухлиноносіїв, $p \leq 0,05$.

Застосування ліпосомної форми БКУ, навпаки, призводить до підвищення вмісту цитохрому P-450 в 1,7 раза (рис. 1), знижує швидкість його інактивації (рис. 3) та окислення білкових сульфгідрильних груп (рис. 4) порівняно з дослідним контролем, однак не досягає показників інтактних тварин.

Нами проведено фосфоліпідну терапію перед введенням ліпосомної форми БКУ для попередження деструкції внутрішньоклітинних мембран печінки. Встановлено, що вже в логарифмічну фазу росту пухлини комбіноване введення фосфатидилхолінових ліпосом із ліпосомним БКУ (через дві години) сповільнює швидкість переходу цитохрому P-450 у P-420 (рис. 2), окислення білкових SH-груп (рис. 4) та зниження вмісту досліджуваного ферменту (рис. 1) порівняно з досліджуваними показниками групи контрольних щурів-пухлиноносіїв. Чотирнадцятиденне введення БКУ в ліпосомній формі на фоні попереднього введення фосфатидилхолінових ліпосом призводить до наближення вмісту цитохрому до контрольних величин (рис. 1), сприяє нормалізації швидкості переходу відновленої форми цитохрому P-450 в його неактивну форму P-420 (рис. 3). Окислення SH-груп також знижується і наближається до значень відповідних показників у інтактних тварин (рис. 4). Імовірно, попередня фосфоліпідна терапія перед введенням ліпосомної форми БКУ насичує ліпосомними везикулами клітини системи мононуклеарних фагоцитів [20], які вже через дві години втрачають здатність захоплювати противухлинний засіб, і він безпосередньо транспортується в пухлину. Крім того, фосфатидилхолін, який є основною складовою ліпосом, сприяє відновленню внутрішньоклітинних мембранних структур печінки, які стабілізують досліджуваний гемопротейн у функціонально активній конформації.

Таким чином, ріст карциноми Герена в організмі супроводжується підвищенням

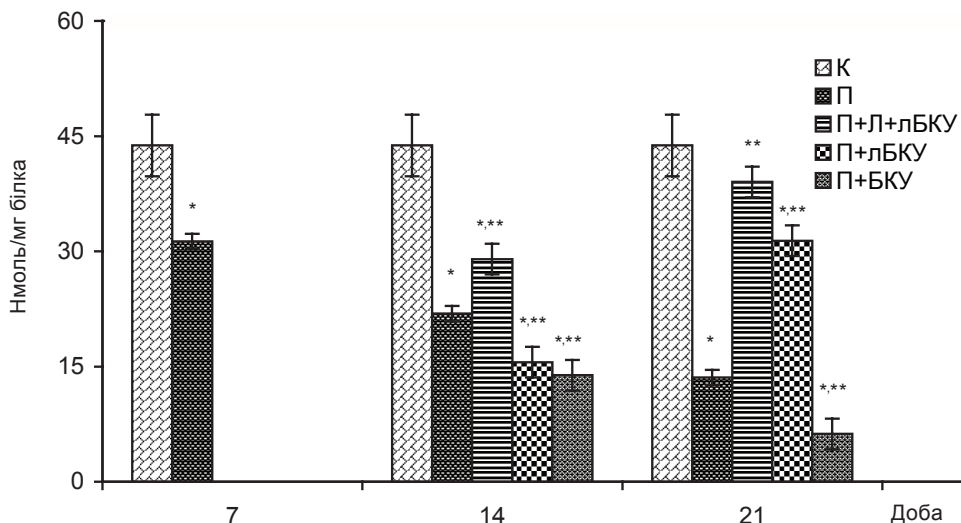


Рис. 4. Вміст сульфгідрильних груп білків мікросомної фракції печінки щурів-пухлиноносців за дії хімічного засобу гідробромід 5-(5',6'-бензкумароїл-3')-метиламіноурацилу в ліпосомній і неліпосомній формах.

швидкості переходу цитохрому *P*-450 в його неактивну форму *P*-420, зниженням вмісту цитохрому *P*-450 та сульфгідрильних груп білків у мікросомній фракції печінки. Така деструкція цитохрому *P*-450 не призводить до руйнування гему ферменту, оскільки вона є оборотною і відновлюється при комбінованому введенні в організм ненавантажених фосфатидилхолінових ліпосом та БКУ в ліпосомній формі на термінальних етапах росту новоутворення в організмі. Ефективність дії БКУ в ліпосомній формі значно перевищує таку неінкапсульованої його форми на стабілізацію мікросомного цитохрому *P*-450 печінки щурів у стаціонарну фазу розвитку новоутворення в організмі.

Стабілізуючий ефект БКУ в ліпосомній формі щодо мікросомного цитохрому *P*-450 печінки щурів (в стаціонарну фазу розвитку карциноми Герена) значно перевищує дію неінкапсульованої його форми.

ВЛИЯНИЕ ЛИПОСОМНОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА ГИДРОБРОМИД 5-(5',6'-БЕНЗКУМАРОИЛ-3')-МЕТИЛАМИНОУРАЦИЛА НА ЦИТОХРОМ *P*-450 В МИКРОСОМНОЙ ФРАКЦИИ ПЕЧЕНИ КРЫС-ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЕЙ

М. М. Марченко, Г. П. Копильчук,
О. В. Кеца, И. А. Шмарак

Черновицкий национальный университет
имени Юрия Федьковича, Украина;
e-mail: ketsa80@mail.ru

Исучена скорость тепловой инактивации цитохрома *P*-450, содержание белковых сульфгидрильных групп и цитохрома *P*-450 в микросомной фракции печени крыс на разных этапах роста карциномы Герена в их организме, а также при действии на организм противоопу-

холевого химического препарата гидробромид 5-(5',6'-бензкумароил-3')-метиламиноурацила (БКУ) в липосомной и нелипосомной формах. Проведено введение липосомной формы БКУ на фоне предварительного (за 2 часа) введения суспензии фосфатидилхолиновых липосом. Отмечено, что процесс роста в организме карциномы Герена сопровождается понижением содержания цитохрома P-450 и белковых SH-групп в микросомной фракции печени крыс, а также повышением скорости перехода микросомного цитохрома P-450 в его неактивную форму P-420. Исследование стабильности цитохрома P-450 показало, что эффективность противоопухолевого липосомного средства БКУ значительно преобладает над эффективностью действия его неинкапсулированной формы у крыс-опухоленосителей на конечных этапах развития новообразования. Предварительное введение фосфатидилхолиновых липосом приближает исследуемые показатели к уровню контроля в стационарный период роста карциномы Герена.

Ключевые слова: инактивация цитохрома P-450, микросомная фракция, сульфгидрильные группы белков, липосомный противоопухолевый препарат гидробромид 5-(5',6'-бензкумароил-3')-метиламиноурацила, печень, карцинома Герена.

EFFECT OF LIPOSOMAL ANTITUMOR PREPARATION HYDROBROMIDE 5-(5',6'-BENZOCUMAROILE-3')-METHYLAMINO URACIL CYTOCHROME P-450 IN THE MICROSOMAL LIVER FRACTION OF RATS TUMOR CARRIERS

M. M. Marchenko, G. P. Kopylchuk, O. V. Ketsa, I. A. Shmarakov

Fedkovych Chernivtsi National University, Ukraine;
e-mail: ketsa80@mail.ru

S u m m a r y

Cytochrome P-450 thermal inactivation rate, and content of protein sulfhydryl groups and cytochrome P-450 in the microsomal liver fraction of rats at different stages of Huerin's carcinoma growth were investigated. Liposomal form of BCU administration on the background of preliminary (for 2 hours) administration of phosphatidylcholine liposomes suspension was performed.

The low level of cytochrome P-450, protein SH-groups in microsomal liver fraction and increase of the rate of transition of microsomal cyto-

chrome P-450 in P-420 was shown in the dynamics of Huerin's carcinoma growth in an organism. Low microsomal cytochrome P-450 distraction was shown in the rat liver under conditions of antitumor liposomal preparation BCU injection on the 21st day after the transplantation of Huerin's carcinoma. At the same time nonliposomal BCU caused the opposite effect. The preliminary administration of phosphatidylcholine liposomes favours the approach of the investigated parameters to the control values on the terminal stages of tumour growth.

Key words: cytochrome P-450 inactivation, microsomal fraction, protein sulfhydryl groups, liposomal antitumor preparation hydrobromide 5-(5',6'-benzocumaroile-3')-methylamino-uracil, liver, Huerin's carcinoma.

1. *Пентюк О. О., Качула С. О., Герич О. Х.* // Укр. біохім. журн. — 2004. — **76**, № 5. — С. 16–27.
2. *Simon A.* The Precise Universe of Cytochrome P-450. — Berlin.: Byk Gulden, 2000. — 214 p.
3. *Марченко М. М., Копильчук Г. П., Григор'єва О. В.* // Доп. НАН України. — 2000. — № 3. — С. 192–195.
4. *Будкер В. Г., Вахрушева Т. Е., Кеселева Е. В., Христюлова Н. Б.* // Хим.-фарм. журн. — 1987. — № 1. — С. 347–352.
5. *Марченко М. М., Чорна О. В.* // Науковий вісник ЧНУ. Серія біологія. — 2003. — Вип. 169. — С. 9–14.
6. *Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США* / Под ред. З. П. Софьиной, А. Б. Сыркина (СССР), А. Голдина, А. Кляйна (США). — М.: Медицина, 1979. — 296 с.
7. *Schenkman J. B., Cinti D. L.* // Methods in Enzymology. — 1978. — **52**, part C. — P. 83–89.
8. *Omura T., Sato R.* // J. Biol. Chem. — 1964. — **239**, N 7. — P. 2379–2385.
9. *Бачманова Г. И., Карузина И. И., Менгазетдинов Д. Э. и др.* // Биохимия — 1981. — **46**, № 2. — С. 280–285.
10. *Мохосоев И. М., Кузнецова Г. П., Альтерман М. А. и др.* // Биохимия — 1987. — **52**, № 10. — С. 1649–1658.
11. *Murphy M. E., Kehrer J. P.* // Biochem. J. — 1989. — **260**, N 2. — P. 359–364.
12. *Lowry O. H., Rosenbrough M. J., Farr A. L., Rendal R. J.* // J. Biol. Chem. — 1951. — **193**, N 1. — P. 265–275.
13. *Suzuki N., Higuchi T., Nagano T.* // J. Am. Chem. Soc. — 2002. — **124**, N 32. — P. 9622–9628.

14. Арчаков А. И., Згода В. Г., Карузина И. И. // *Вопр. мед. хим.* – 1998. – **44**, № 1. – С. 3–27.
15. Куликова Л. Н. // *Биомед. химия* – 2004. – **50**, № 3. – С. 260–268.
16. Vapiro T. E., Hasler J. A., Ridderstrom M. A., Masimirembwa C. M. // *Biochem. Pharmacol.* – 2002. – **64**, N 9. – P. 1387–1398.
17. Березов Т. Т., Яглова Н. В., Дмитриева Т. Б. и др. // *Вестн. РАМН* – 2004. – № 5. – С. 42–47.
18. Марченко М. М., Кеца О. В. // *Укр. біохім. журн.* – 2005. – **77**, № 2. – С. 141–146.
19. Новиков К. Н. // *Автореф. дис. д-ра биол. наук.* – М.: Московский гос. ун-т, 2004. – 45 с.
20. Исанин Н. А., Розенберг О. А., Щербаков Л. М. и др. // *Вопр. мед. хим.* – 1984. – **30**, № 1. – С. 37–41.

Отримано 20.02.2006