

УДК 612.017.1

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПОЛИРЕАКТИВНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ И РАЗЛИЧНЫХ АНТИГЕНОВ

С. А. БОБРОВНИК, М. А. ДЕМЧЕНКО, С. В. КОМИСАРЕНКО

*Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
e-mail: s-bobrov@bk.ru*

Исследовано влияние твина 20, а также лизоцима и протамина на способность полиреактивных иммуноглобулинов (ПРИГ) связываться с различными антигенами. Тогда как твин 20 ингибирует реакцию связывания ПРИГ с антигенами, сорбированными на иммунологических плашках, лизоцим и протамин, наоборот, усиливают ее. Поскольку смесь протамина и лизоцима в оптимальных для стимуляции реакции ПРИГ–антиген не усиливает эффект, нами сделан вывод, что механизм воздействия этих протеинов на реактивность ПРИГ является однотипным. Особый интерес, по нашему мнению, вызывает то, что твин 20 в присутствии лизоцима или протамина не ослабляет действие этих протеинов на реактивность ПРИГ по отношению к сорбированным на плашке антигенам, а, наоборот, усиливает этот эффект.

Ключевые слова: полиреактивные иммуноглобулины, взаимодействие антиген–антитело, лизоцим, протамин, твин 20, ELISA.

Иммуноглобулиновые молекулы, способные неспецифически связываться с различными серологически неродственными антигенами, были названы нами полиреактивными иммуноглобулинами (ПРИГ). Несмотря на то, что со времени обнаружения ПРИГ в сыворотках человека и животных прошло уже более двадцати лет [1, 2], многие особенности связывания ПРИГ и разнообразных антигенов, а также влияние различных физико-химических факторов на этот процесс остаются недостаточно изученными. Вместе с тем уже в первых наших работах было показано, что взаимодействие ПРИГ с антигенами имеет существенные отличия от связывания специфических антител с соответствующими антигенами [3]. Прежде всего, это связано с тем, что ПРИГ способны связываться с антигенами неспецифически и, следовательно, этот процесс может быть блокирован или затруднен в присутствии неродственных антигенов, которые способны связываться с участками ПРИГ, ответственными за взаимодействие с антигенами.

Механизм взаимодействия специфических антител с соответствующими антигенами изучен довольно хорошо, тогда как изучению механизмов взаимодействия ПРИГ–антиген посвящено относительно мало работ. Известно,

что для объяснения связывания специфических антител с антигенами используют как модель ключ–замок, так и модель индуцированной подгонки [4]. Очевидно, что взаимодействующие между собой поверхности антитела и антигена должны быть взаимно комплементарными. При этом очень часто комплементарной является не только архитектура поверхностей, но и заряд взаимодействующих молекул, т.е. отрицательному заряду на поверхности антитела часто соответствует положительный заряд на антигене, и наоборот. Такая комплементарность взаимодействующих молекул позволяет получить высокую степень специфичности антител к соответствующим антигенам.

Очевидно, что подобный механизм взаимодействия не может быть использован при связывании ПРИГ с разнообразными, совершенно не сходными по структуре антигенами. Поскольку взаимодействие ПРИГ–антиген все же происходит, то должны быть иные механизмы, опосредующие этот процесс. Ранее нами уже проводились исследования данного вопроса и было установлено, что гидрофобное взаимодействие между молекулами ПРИГ и антигенами является важнейшим из факторов, обуславливающих процесс связывания данных реагентов [5, 6]. Тем не менее, многие стороны процесса взаимодей-

ствия ПРИГ и антигенов остаются неизученными, тогда как исследованию перекрестно реагирующих антител и их роли в иммунной системе в последние годы уделяют всё больше внимания [7–9]. Однако, по нашему мнению, ПРИГ и перекрестно реагирующие антитела – это различные субстанции.

Следует отметить, что некоторые молекулы, хотя и не являются антигенами, но способны связываться с гидрофобными участками антигенов или молекул ПРИГ, а также могут существенно препятствовать взаимодействию ПРИГ и антигенов [5,6]. Упомянутые различия во взаимодействии ПРИГ с антигенами и перекрестно реагирующих антител с антигенами могут быть использованы для идентификации ПРИГ и для того, чтобы различить их неспецифическое связывание с антигенами с аналогичной специфичной реакцией антител и соответствующих антигенов.

Настоящая работа посвящена дальнейшему изучению особенностей взаимодействия ПРИГ с сорбированными на плашке антигенами и исследованию влияния на этот процесс как низкомолекулярных субстанций (таких как, например, твин 20), так и воздействию на данную реакцию высокомолекулярных антигенов, таких как протеиновые молекулы, а именно, лизоцим или протамин.

Материалы и методы

В настоящей работе исследовали сыворотку мышей BALB/c, предварительно иммунизированных овалбумином, или коммерческие моноклональные антитела, специфичные к овалбумину. В качестве антигенов в работе использовали овалбумин, бычий сывороточный альбумин (БСА), миоглобин лошади, протамин. Все препараты фирмы Sigma (США); лизоцим – фирмы ICN Biomedical Inc. (США).

Чтобы сорбировать антигены на плашке для исследования связывания ПРИГ мы использовали разработанный нами ранее метод, в котором сорбируемый антиген высушивается на плашке из 1%-го раствора NH_4HCO_3 при 37 °С [10]. Ранее нами было показано, что такой способ сорбции антигенов на плашке, во-первых, повышает эффективность сорбции (по сравнению с традиционной инкубацией раствора антигена в плашке), что позволяет использовать на порядок меньшие концентрации антигена. Во-вторых,

предложенный нами метод сорбции приводит к более выраженной денатурации сорбированных антигенов, что может быть недостатком при исследовании связывания специфичных антител, однако является положительным фактором для исследования ПРИГ, обладающих повышенным сродством к денатурированным протеинам. В случае исследования специфичных антител к овалбумину, данный антиген сорбировали на платах общепринятым методом, инкубируя раствор овалбумина в забуференном фосфатным буфером (рН 7,2) физиологическом растворе NaCl (ЗФР) в течение суток при 4 °С.

В работе мы исследовали свойства ПРИГ двух типов. Первый тип ПРИГ – это такие антитела, которые были получены нами искусственно, путём трансформации в ПРИГ моноклональных антител, специфичных к овалбумину, с помощью 4 М KSCN [11]. С этой целью специфичные к овалбумину коммерческие моноклональные антитела, предварительно разведенные 1 : 10 в физиологическом растворе NaCl, смешивали с 10 М раствором KSCN в таком соотношении, чтобы конечная концентрация KSCN была равна 4 М. Смесь инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре (около 25 °С), после чего разводили в 1000 или более раз, а затем использовали в различных экспериментах в качестве ПРИГ. Такие ПРИГ в настоящей статье мы будем обозначать ПРИГ_{KSCN}.

Второй тип ПРИГ – это так называемые «интактные», или «натуральные» ПРИГ, т.е. такие ПРИГ, которые ничем не были обработаны и которые изначально присутствовали в сыворотках животных или человека. Чтобы отличить эти сывороточные ПРИГ от полученных нами с помощью трансформации моноклональных антител путем их инкубации с 4 М KSCN, в настоящей статье будем обозначать эти «интактные» ПРИГ как ПРИГ_{интакт}. Очевидно, что значительный интерес представлял вопрос, будут ли оба типа ПРИГ, т.е. ПРИГ_{KSCN} и ПРИГ_{интакт}, вести себя одинаково при взаимодействии с антигенами, или же они будут чем-то отличаться в используемых иммунохимических тестах.

Взаимодействие ПРИГ с сорбированными на плашке антигенами изучали или в ЗФР, или в том же ЗФР, но с добавлением твина 20, конечная концентрация которого была равна 0,05% (ТЗФР), если специально не указана концентрация твина 20 для тех опытов, где она изменялась.

В большинстве наших экспериментов к ЗФР или к ТЗФР добавляли различные концентрации лизоцима или протамина (или же оба этих реагента) для того, чтобы изучить влияние данных протеинов на активность ПРИГ или антител по отношению к сорбированным на плашках антигенам. Исследуемые образцы ПРИГ или антител смешанные с растворами лизоцима или протамина (по 0,1 мл) вносили в лунки плат с сорбированным антигеном, инкубировали 1 час при 37 °С, затем плашку промывали и с помощью иммуноэнзимного анализа определяли количество ПРИГ или антител, связавшихся с плашкой.

Результаты и обсуждение

Ранее нами было замечено, что некоторые антигены, в отличие от их большинства, не только не блокируют ПРИГ в растворе, препятствуя связыванию их с сорбированными на плашке антигенами, но при определенных концентрациях, наоборот, способствуют связыванию ПРИГ с сорбированным антигеном. Наиболее активными антигенами в этом отношении были лизоцим и протамин (неопубликованные данные). В связи с этим представлялось целесообразным более подробно изучить влияние лизоцима и протамина на способность ПРИГ взаимодействовать как с данными антигенами, так и с иными, неродственными им.

На рис. 1 представлена зависимость связывания ПРИГ_{KSCN} с сорбированным на плашке лизоцимом или с сорбированным БСА в зависимости от концентрации лизоцима, находящегося в растворе с ПРИГ_{KSCN}. Как видно из рисунка, обе кривые очень похожи и показывают, что количество ПРИГ_{KSCN}, связавшегося с сорбированными антигенами, возрастает при увеличении концентрации лизоцима в растворе около 0,1 мг/мл и достигает максимума при 1 мг/мл. Тот факт, что имеющийся в растворе лизоцим практически не препятствует связыванию ПРИГ_{KSCN} с сорбированным на плашке лизоцимом говорит о том, что в данном случае имеется полностью неспецифичная реакция иммуноглобулинов с сорбированными антигенами. В противном случае лизоцим в растворе заблокировал бы те иммуноглобулины, которые связываются с сорбированным на плашке лизоцимом благодаря специфической реакции.

Сходная ситуация обнаружена нами и в отношении влияния протамина на реактивность

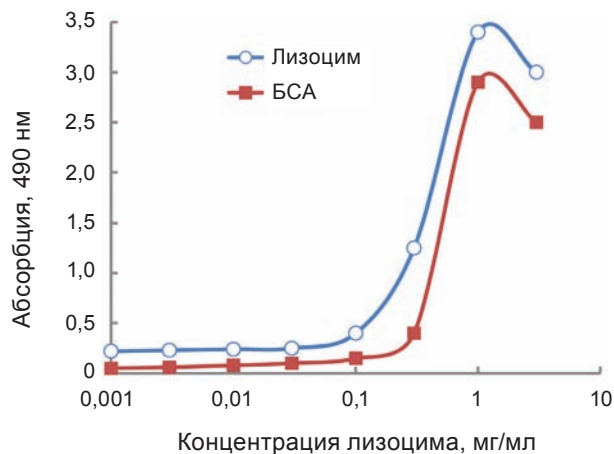


Рис. 1. Влияние лизоцима в зависимости от концентрации на связывание ПРИГ_{KSCN} с сорбированным на плашке БСА или с лизоцимом

ПРИГ_{KSCN}, полученных путем трансформации моноклональных антител к овальбумину с помощью 4 М KSCN (рис. 2). Здесь также при определенной концентрации протамина (около 0,005 мг/мл) в растворе начинается заметная стимуляция связывания ПРИГ_{KSCN} с сорбированными на плашке антигенами, такими как БСА, миоглобин и протамин. Как и в случае с лизоцимом, протамин в растворе не блокирует связывание ПРИГ_{KSCN} с сорбированным на плашке протамином, что свидетельствует о неспецифичности связывания ПРИГ_{KSCN} с протамином на плашке, как и с остальными антигенами.

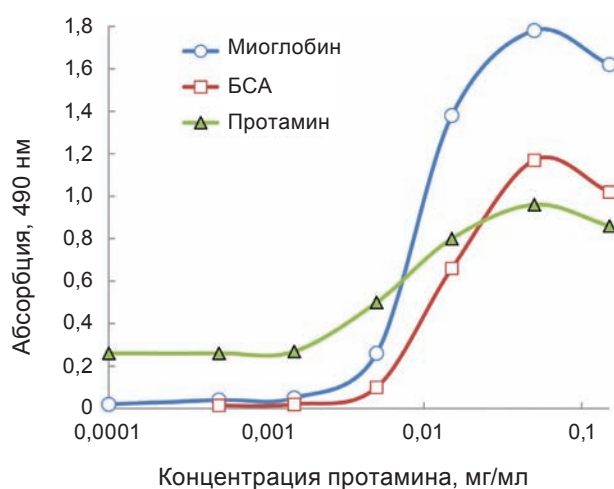


Рис. 2. Влияние протамина в зависимости от концентрации на реактивность ПРИГ по отношению к сорбированным на плашке БСА, миоглобину лошади или к протамины

Обращает на себя внимание тот факт, что для достижения максимального эффекта в стимуляции связывания ПРИГ_{KSCN} с антигенами на плашке требуется всего 0,1 мг/мл протамина в растворе, тогда как в случае использования лизоцима для достижения подобного эффекта требуется в десять раз большая концентрация. Это свидетельствует о том, что протамин, по видимому, обладает более выраженной способностью стимулировать реакцию ПРИГ_{KSCN} с антигенами, чем лизоцим.

Следующим вопросом, представляющим научный и практический интерес, был вопрос о том, одинаково ли влияют лизоцим и протамин на связывание с сорбированными антигенами искусственно полученных ПРИГ_{KSCN} (при помощи обработки моноклональных антител 4 М KSCN, т.е. ПРИГ_{KSCN}) и сывороточных «натуральных» ПРИГ, т.е. тех ПРИГ_{интакт}, которые изначально существуют в сыворотках человека и животных и которые не подвергались никакой обработке. С этой целью вначале подбирали разведения интактной сыворотки (содержащей ПРИГ_{интакт}) и полученного нами препарата ПРИГ_{KSCN} так, чтобы они связывались с сорбированными антигенами примерно одинаково, а затем исследовали влияние лизоцима и протамина в разных концентрациях на связывание этих препаратов с сорбированным антигеном.

Оказалось, что взаимодействие как ПРИГ_{KSCN}, так и ПРИГ_{интакт} с сорбированным на плашке антигеном могло быть усилено примерно одинаково в присутствии растворов лизоцима или протамина различной концентрации, что говорит об их несомненном сходстве, по крайней мере, в отношении данного теста. Вместе с тем, как было нами установлено, различные концентрации растворов лизоцима или протамина не влияют на связывание специфических антител с соответствующим антигеном, например, на связывание антител к овальбумину с сорбированным овальбумином. Следовательно, благодаря этому свойству ПРИГ у исследователей появляется дополнительный тест, который позволяет различить взаимодействие специфических антител или ПРИГ_{интакт} с одним и тем же антигеном даже в том случае, если данные антитела и ПРИГ_{интакт} находятся в смеси в исследуемых сыворотках животных или человека.

Еще один важный вопрос – вопрос о том, является ли механизм усиления реактивности ПРИГ с помощью растворов лизоцима и протамина одним и тем же или это разные пути, в результате чего совместное воздействие лизоцима и протамина приведет к суммарному эффекту и, следовательно, к еще большему усилению реактивности, чем приводит воздействие каждого из протеинов по отдельности. Чтобы получить от-

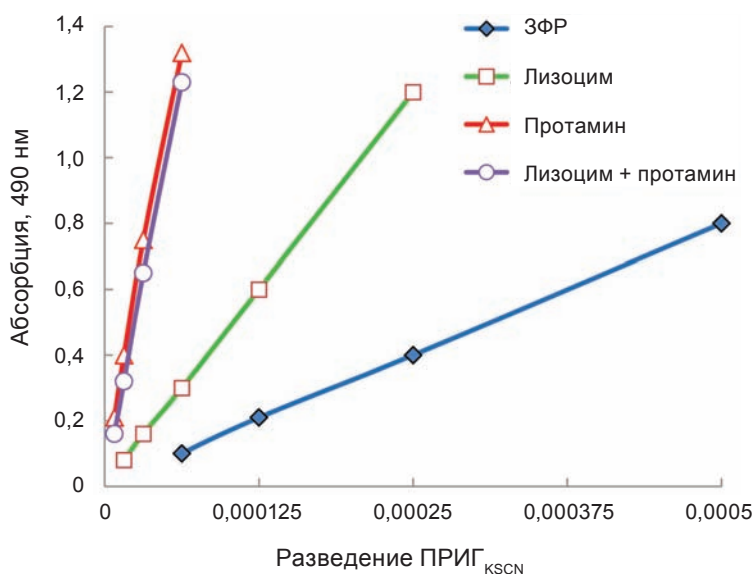


Рис. 3. Влияние растворов лизоцима и протамина в оптимальных концентрациях (1 мг/мл лизоцима или 0,1 мг/мл протамина), а также смеси указанных реагентов на связывание ПРИГ_{KSCN} с сорбированным на плашке миоглобином лошади по сравнению со связыванием тех же образцов ПРИГ_{KSCN} в ЗФР

вет на данный вопрос, мы исследовали влияние каждого из протеинов в отдельности или их смеси на связывание ПРИГ с антигенами. Для этого было проведено титрование ПРИГ в растворах указанных реагентов (при их оптимальных дозах). Было установлено, что каждый из указанных протеинов в отдельности заметно усиливает связывание ПРИГ с сорбированным на плашке антигеном по сравнению с раститровкой ПРИГ в ЗФР (рис. 3), однако суммарная смесь протамина и лизоцима не приводит к усилению связывания ПРИГ с плашкой по сравнению с вариантом связывания ПРИГ в ЗФР с оптимальной концентрацией одного только протамина. Эти результаты говорят в пользу предположения о том, что лизоцим и протамин действуют на ПРИГ однотипно, т.е. их механизм усиления активности ПРИГ по отношению к антигенам сходный и при достижении максимальной активации ПРИГ с помощью оптимальной концентрации протамина дополнительного усиления с помощью раствора лизоцима получить невозможно. В связи с этим в дальнейшем нам представлялось целесообразным изучить механизм усиления реактивности ПРИГ в отношении сорбированных на плашке антигенов, исследуя не оба протеина, а только один из них, если не возникнут новые обстоятельства, делающие целесообразным исследование обоих протеинов.

Поскольку ранее нами было установлено, что одним из эффективных реагентов, которые блокируют связывание ПРИГ с антигенами является твин 20 [5, 6], то представлялось целесообразным изучить, как исследуемые в данной работе реагенты (лизоцим или протамин) будут влиять на реактивность ПРИГ в присутствии раствора твина 20. Известно, что твин 20 обычно используют для частичной блокировки неспецифического связывания иммуноглобулинов с плашкой с целью повышения специфичности реакций, изучаемых методом ELISA. Например, на рис. 4 показано, что твин 20 блокирует связывание ПРИГ с сорбированным на плашке антигеном, но практически не влияет на связывание специфических антител к соответствующему антигену. В связи с этим можно было ожидать, что влияние лизоцима или протамина на связывание ПРИГ с антигенами может быть каким-либо образом под влиянием твина 20 изменено.

Наши опыты показали, что действительно в присутствии твина 20 происходят значи-

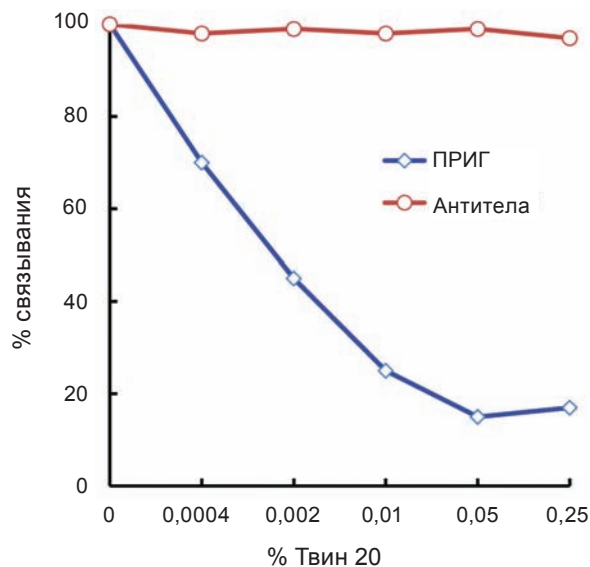


Рис. 4. Влияние концентрации твина 20 в ЗФР на связывание специфических антител к овалбумину или ПРИГ_{KSCN} с сорбированным на плашке овалбумином

тельные изменения активности как ПРИГ_{KSCN}, так и ПРИГ_{интакт} (рис. 5). Как видно из рисунка, в отсутствие протамина или при очень низкой его концентрации (ниже 0,003 мг/мл), способность ПРИГ_{KSCN} связываться с сорбированным на плашке антигеном значительно снижается (примерно в десять раз) в ЗФР с твином 20, чем в ЗФР, поскольку первый раствор содержит 0,05% твина 20. Однако при увеличении концентрации протамина до 0,01 мг/мл и выше происходят резкие изменения активности ПРИГ в присутствии

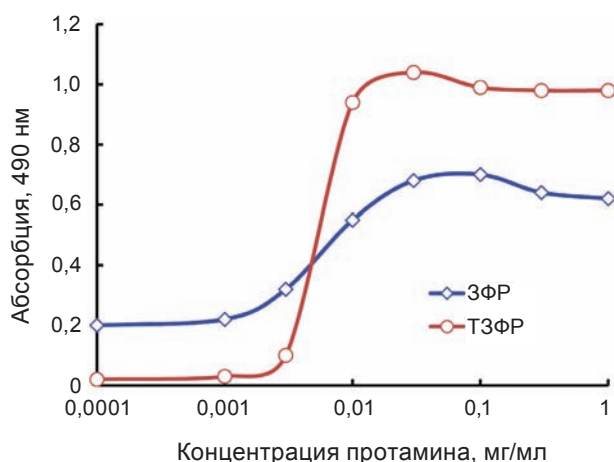


Рис. 5. Влияние протамина на связывание ПРИГ_{KSCN} с сорбированным на плашке антигеном в ЗФР или в ТЗФР

твина 20 и уже активность ПРИГ, наоборот, становится заметно выше в ЗФР с твином 20, чем в ЗФР (рис. 5). Следовательно, твин 20 в данном случае не только не отменяет эффект усиления реактивности ПРИГ под влиянием протамина, но и приводит к намного более выраженному усилению его реактивности.

Полученный результат оказался весьма неожиданным, поскольку в данном случае сочетание фактора, который усиливает реактивность ПРИГ (а именно, протамин) с фактором, который заметно снижает реактивность ПРИГ (твин 20), приводит не к усреднению действия обоих факторов, а изменяет направленность действия твина 20 с супрессорного влияния на стимулирующее влияние данной реакции. Причина такого неожиданного усиления реактивности ПРИГ при суммарном воздействии твина 20 и протамина на ПРИГ и его взаимодействие с антигенами еще недостаточно понятны.

Одной из рабочих гипотез, объясняющих данный феномен, является следующая. Мы полагаем, что поскольку ПРИГ способны эффективно взаимодействовать с различными антигенами, особенно если антигены экспрессируют гидрофобные участки на своей поверхности, то, по-видимому, любая из молекул ПРИГ может связываться с другой молекулой ПРИГ активными центрами их, в результате чего происходит взаимная блокировка. В этом случае добавление в раствор ПРИГ любых факторов, способствующих диссоциации этих комплексов, должно приводить к усилению реактивности ПРИГ.

Мы предполагаем, что молекулы лизоцима и протамина, имеющие положительный заряд в нейтральном растворе, могут связываться с отрицательно заряженными участками молекул ПРИГ и, благодаря отталкиванию друг от друга получивших положительный заряд комплексов, могут способствовать диссоциации этих комплексов ПРИГ. Твин 20, по-видимому, тоже способен усиливать диссоциацию комплексов ПРИГ, однако вместе с этим он может также блокировать гидрофобные участки ПРИГ и антигена и тем самым значительно ослаблять связывание ПРИГ с антигенами. Однако в случае нахождения ПРИГ в растворе с твином 20 и с протамином, эффект от диссоциации комплексов, видимо, является настолько большим,

что он намного превосходит эффект блокировки ПРИГ молекулами твина 20, и в результате получается явная стимуляция связывания ПРИГ в присутствии смеси протамина и твина 20.

Насколько верным является наше предположение покажут дальнейшие исследования, однако уже сейчас можно отметить, что данный эффект, характерный для ПРИГ и отсутствующий в случае взаимодействия специфичных антител с соответствующими антигенами, является весьма полезным, поскольку позволяет различать ПРИГ и специфичные антитела, находящиеся в смеси. В том случае, когда необходимо оценить содержание в исследуемых сыворотках количество естественных перекрестно реагирующих антител и количество ПРИГ, такой тест, позволяющий сделать эти различия, может оказаться весьма ценным.

Таким образом, в настоящей работе нами было установлено, что как лизоцим, так и протамин способны усиливать связывание ПРИГ с сорбированным на плашке антигеном, причем этот эффект является дозависимым и одновременно антигенезависимым, поскольку он не зависит от антигена, сорбированного на плашке. Лизоцим и протамин способны усиливать реактивность ПРИГ с помощью одного и того же или очень похожего механизма, в связи с чем смесь этих реагентов в оптимальной концентрации не приводит к суммарному усилению реактивности ПРИГ, которая равна усилению, индуцируемому более активным реагентом, в данном случае протамином. Хотя твин 20 способен супрессировать связывание ПРИГ с антигенами, однако его смесь с протамином еще более эффективна в отношении усиления реактивности ПРИГ, чем сам протамин. Нами высказано предположение, что этот феномен связан с тем, что смесь твина 20 и протамина очень эффективно индуцирует диссоциацию комплексов молекул ПРИГ, связавшихся между собой, и тем самым многократно повышает количество молекул ПРИГ, способных взаимодействовать с антигеном. Обнаруженный эффект смеси протамина и твина 20 на реактивность ПРИГ позволит использовать его для дифференцировки ПРИГ от сопутствующих в сыворотке естественных антител, специфичных к определенным антигенам.

ОСОБЛИВОСТІ ВЗАЄМОДІЇ ПОЛІРЕАКТИВНИХ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ ІЗ РІЗНИМИ АНТИГЕНАМИ

*С. А. Бобровник, М. О. Демченко,
С. В. Комісаренко*

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ;
e-mail: s-bobrov@bk.ru

Досліджено вплив твіну 20, а також лізоциму і протаміну на здатність поліреактивних імуноглобулінів (ПРИГ) зв'язуватись із різними антигенами. В той час як твін 20 інгібує реакцію зв'язування ПРИГ з антигенами, сорбованими на імунологічних плашках, лізоцим і протамін, навпаки, підсилюють її. Оскільки суміш протаміну і лізоциму за концентрацій, оптимальних для ефекту підсилення, не приводить до збільшення стимуляції зв'язування ПРИГ, зроблено висновок, що механізм впливу цих протеїнів на реактивність ПРИГ є однотиповим. Особливий інтерес, на нашу думку, викликає те, що твін 20 у присутності лізоциму або протаміну не призводить до ослаблення впливу цих протеїнів на реактивність ПРИГ відносно до сорбованих на плашках антигенів, а, навпаки, підсилює цей ефект.

Ключові слова: поліреактивні імуноглобуліни, взаємодія антиген–антитіло, лізоцим, протамін, твін 20, ELISA.

INTERACTION PECULIARITIES OF POLYREACTIVE IMMUNOGLOBULINS AND VARIOUS ANTIGENS

*S. A. Bobrovnik, M. O. Demchenko,
S. V. Komisarenko*

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: s-bobrov@bk.ru

The influence of twin 20, lysozyme and protamine on the capability of polyreactive immunoglobulins (PRIG) to attach to various antigens was inves-

tigated. Twin 20 can inhibit the binding of PRIG to antigens on immunological plates but lysozyme and protamine can enhance it. As far as the mixture of the optimal concentrations of lysozyme and protamine cannot increase PRIG-antigen interaction in comparison to the optimal dose of protamine, we have concluded that the mechanism of their effect on PRIG binding is similar. Of special interest is the fact that twin 20 at optimal concentration of lysozyme or protamine does not decrease PRIG binding to various antigens but, on the contrary, increases PRIG-antigen interaction.

Key words: polyreactive immunoglobulins, antigen-antibody interaction, lysozyme, protamine, twin 20, ELISA.

1. *Бобровник С. А.* // Укр. біохім. журн. – 1990. – **62**, № 5. – С. 86–89.
2. *Бобровник С. А., Лященко К. П., Комісаренко С. В.* // Доп. АН УРСР. – 1990. – № 6. – С. 71–74.
3. *Бобровник С. А., Маринец А. В.* // Укр. біохім. журн. – 1993. – **65**, № 5. – С. 21–26.
4. *Берзофски Д. А., Берковер А. Дж.* / В кн. *Иммунология*. Под ред. У. Пола. – Москва: Мир, 1989. – Т. **3**. – С. 5–88.
5. *Бобровник С. А.* // Укр. біохім. журн. – 2001. – **73**, № 2. – С. 116–122.
6. *Бобровник С. А.* // Укр. біохім. журн. – 2002. – **74**, № 2. – С. 26–33.
7. *Zhou Z. H., Zhang Y., Hu Y. F. et al.* // *Cell. Host. Microbe*. – 2007. – **15**. – С. 51–61.
8. *Zhou Z. H., Tzioufas A. G., Notkins A. L.* // *J. Autoimmun.* – 2007. – **29**. – С. 219–228.
9. *Xiong Y., Zhou Z. H., Notkins A. L.* // *Scand. J. Immunol.* – 2012. – **76**. – С. 342–343.
10. *Бобровник С. А., Стародуб Н. Ф.* // *Иммунология*. – 1988. – № 5. – С. 83–85.
11. *Бобровник С. А.* // Укр. біохім. журн. – 1997. – **69**, № 5–6. – С. 97–109.

Получено 29.04.2013