

О. В. Оришака, І. Л. Вовчук, С. А. Петров

ВИДІЛЕННЯ ЧАСТКОВО ОЧИЩЕНОЇ ТІАМІНПІРОФОСФОКІНАЗИ З НЕМАЛІГНІЗОВАНОЇ ТА ПУХЛИННОЇ ТКАНИНИ МІОМЕТРІЯ

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, Одеса, Україна

УДК 577.152.344:577.15.072

О. В. Оришака, І. Л. Вовчук, С. А. Петров

ВЫДЕЛЕНИЕ ЧАСТИЧНО ОЧИЩЕННОЙ ТИАМИНПИРОФОСФОКИНАЗЫ ИЗ НЕМАЛИГНИЗИРОВАННОЙ И ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ МИОМЕТРИЯ

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, Одесса, Украина

Цель работы состояла в препаративном выделении и частичной очистке Т-киназы для дальнейшего изучения ее свойств. Фракционное осаждение проводили сульфатом аммония, определение тиамин в диализатах — методом Г. Д. Елисейевой.

При 60 % насыщении белкового раствора сульфатом аммония доброкачественной и 40 % насыщении белкового раствора сульфатом аммония злокачественной опухоли миометрия зарегистрировано уменьшение количества фракций фермента Т-киназы до одной по сравнению с немалигнизированной тканью.

Установлено, что метод поэтапного фракционирования способствует иммобилизации Т-киназы, которая приводит к конформационным изменениям, повышающим активность и стабильность фермента. Процесс малигнизации миометрия приводит к уменьшению количества фракций фермента.

Ключевые слова: тиаминпирофосфокиназа, опухолевая ткань, миометрий.

UDC 577.152.344:577.15.072

O. V. Orishaka, I. L. Vovchuk, S. A. Petrov

EXTRACTION OF PARTLY PURIFIED THIAMINE PYROPHOSPHOKINASE FROM NON-MALIGNANT AND TUMOR TISSUE OF MYOMETRIUM

I. I. Mechnikov Odessa National University, Odessa, Ukraine

T-kinase was extracted from the tissues of brain and liver, from plants and bacteria. In literature there are only few works where T-kinase purification to homogenous state from yeasts, higher plants and rats liver is described. Determination of T-kinase activity in organism tissues at different pathological states is insufficiently presented in literature and there are only several works on study of the enzyme activity in the liver of animals with tumors.

The aim of the study was to elaborate a technique of preparative extraction and partial purification of T-kinase for subsequent study of its properties.

Gradual fractional sedimentation was carried out by ammonium sulfate when saturating protein solution up to 20, 40, 60 and 80%. Each fraction was dialyzed in analogous conditions. Determination of free and total thiamine in dialyzates was carried out using tiochrome method by G. D. Yeliseyeva.

At analysis of myometrium tissue with tumor there was shown loss of T-kinase activity in the process of dialysis and step-by-step fractionation: protein solutions after dialysis, saturated by ammonium sulfate (at the concentrations 20% and 80%) did not possess enzymatic activity. At 40% saturation by ammonium sulfate of protein solution of myometrium tissue with benign neoplasm and at 60% saturation by ammonium sulfate of protein solution of myometrium tissue with malignancy one fraction of T-kinase appeared.

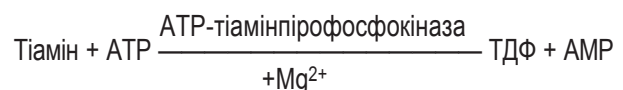
Conclusions:

1. The method of step-by-step fractionation facilitates T-kinase immobilization that results in conformational changes which enhance activity and stability of the enzyme.

2. Malignization process leads to narrowing of multiple spectrum of the enzyme fractions: from three fractions in non-malignant tissue to one in myometrium tissue with benign neoplasm and with malignancy.

Key words: thiamine pyrophosphokinase, tumor tissue, myometrium.

Процеси синтезу тіаміндифосфату (ТДФ) не відрізняються в клітинах тварин, рослин і мікроорганізмів, проте в останніх можливе існування деяких додаткових шляхів. АТФ-тіамінпирофосфокиназа (КФ 2.7.6.2) здійснює перенесення пірофосфатної групи з молекули АТФ до молекули тіаміну за участі іонів магнію, рН-оптимум його активності 6–8,4:



Тіамінпирофосфокиназа (у подальшому — Т-кіназа) виділена з тканин мозку [1; 2] та печінки тварин [3], рослин [4] і бактерій [5]. У літературі є лише декілька робіт з очищення Т-кінази до гомогенного стану: із пивних



дріжджів [5], вищих рослин [4], печінки щурів [3]. Визначення активності Т-кінази у тканинах організму за різних патологічних станів представлено в літературі недостатньо [6], а за ракової патології трапляються лише поодинокі роботи з вивчення активності ферменту, наприклад, у печінці тварин-пухлинноносіїв [7; 8].

На підставі викладеного стає очевидною необхідність дослідження функціонування ферменту при онкогенезі, який бере участь в утворенні біологічно активного коферменту. Вивчення механізмів регуляції активності цього ферменту на молекулярному та тканинному рівнях, порівняльні дослідження біохімічних властивостей Т-кінази немалігнізованої та пухлинної тканини можливі тільки в разі отримання їх в очищеному стані.

З огляду на те, що в сучасній літературі нами не було знайдено інформації щодо виділення та очищення препаратів Т-кінази з тканин немалігнізованого та пухлинного міометрія, **метою** роботи стало препаративне виділення та часткове очищення Т-кінази для подальшого вивчення її властивостей.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводили з 5 зразками немалігнізованої тканини, а також зразками новоутворень міометрія: з 5 зразками доброякісних пухлин (вузлова фібролейоміома матки), з 5 зразками злоякісних пухлин (помірно-диференційована лейоміосаркома матки), вилучених операційним шляхом у жінок, які не отримували доопераційного медикаментозного лікування. Патоморфологічні діагнози були верифіковані за міжнародною класифікацією ВООЗ: визначали морфологічний стан пухлинної тканини і ступінь диференціювання клітин злоякісного новоутворення [9]. Матеріал для дослідження був наданий Одеським обласним онкодиспансером.

Усі зразки міометрія гомогенізували в шести об'ємах 0,25 М розчину сахарози в умовах, які запобігають руйнуванню субклітинних фракцій. Гомогенат центрифугували протягом 90 хв при 20 000 g (+ 4 °С). Осад ресуспендували у половинному об'ємі 0,25 М розчину сахарози, гомогенізували в аналогічних умовах, а супернатанти об'єднували. Білковий екстракт доводили 0,5 М трис-НСІ буфером до рН 7,7 і діалізували проти 40 об'ємів дистильованої води при + 4 °С протягом 12 год. Поступове фракційне осадження проводили сульфатом амонію, насичуючи білковий розчин до 20, 40, 60 та 80 %. Кожну фракцію діалізували в аналогічних умовах.

Визначення вільного та загального тіаміну у діалізатах проводили тіохромним методом Г. Д. Єлісеєвої [10], який ґрунтується на визначенні

продукту реакції окиснення тіаміну у лужному середовищі — тіохрому під дією червоної кров'яної солі, екстракції останнього в органічний розчинник і вимірюванні інтенсивності флуоресценції. В інкубаційну суміш вносили такі компоненти: 0,3 мкмоль тіамінброміду; 12 мкмоль АТФ; 40 мкмоль $MgSO_4$; 50 мкмоль ацетатного буфера рН 5,5; 0,2 мл білкового розчину з відповідних діалізатів. Об'єм проби доводили до 1 мл та інкубували при 37 °С протягом 60 хв. За контроль слугували аналогічні проби з денатурованим білком. Питому активність Т-кінази виражали у наномолях тіаміну на міліграм білка за 1 хв. Вміст білка визначали за методом Lowry [11]. Статистичну достовірність відмінностей між вибірками визначали за допомогою критерію Стьюдента [12].

Результати дослідження та їх обговорення

Експериментально було встановлено, що діаліз — найбільш розповсюджений метод очищення білкових розчинів від низькомолекулярних сполук — не приводив до збільшення відносної та питомої активності ферменту. На цьому етапі відбувалася втрата білка в 2,1 разу порівняно з вихідним розчином. Це свідчить про те, що вихідний гомогенат містив багато низькомолекулярних сполук, які були вилучені в процесі діалізу. При подальшому поступовому осадженні білків сульфатом амонію була встановлена наявність не менше 3 фракцій із Т-кіназою активністю, які осаджувалися за різних ступенів насичення сульфатом амонію (табл. 1).

При 20 % насиченні сульфатом амонію осаджувалося 11,7 % загального білка, збільшувалася відносна активність ферменту в 57,0 разів, питома активність і коефіцієнт очищення збільшувалися в 1028,3 разу, а процент виходу на цьому етапі становив 1,6 % порівняно з вихідним розчином.

Отримані результати свідчать про втрату під час фракціонування речовин, які пригнічують ферментативну активність, серед яких можуть бути ендogenousні інгібітори Т-кінази.

Порівняно з 20 % насиченням сульфатом амонію, фракція з 40 % насиченням сульфатом амонію характеризувалася збільшенням вмісту білка у 3,7 разу, майже незмінною відносною активністю і зростанням питомої активності ферменту в 2,2 разу та коефіцієнта очищення — у 2,4 разу. Процент виходу ферменту при 20 та 40 % насиченні сульфатом амонію практично не відрізнявся.

Порівняння показників фракції 40 % насичення сульфатом амонію та вихідного розчину білка показало, що відносна активність ферменту зросла у 51,0 раз, питома активність і коефіцієнт очищення збільшилися в 244,0 рази,



**Фракціонування сульфатом амонію
тіамінпірофосфокінази немалігнізованого міометрія, M±m n=5**

Етап виділення	Об'єм фракції (V), мл	Вміст білка, мг/мл	Відносна активність (ВА), нмоль тіаміну/г тканини за 1 хв	Питома активність, нмоль тіаміну/мг білка за 1 хв	Загальна активність, V · ВА	Коефіцієнт очищення	Вихід, %
Вихідний розчин білка	35,50±3,20	645±54	15,8±1,7	24,5±3,2	560±54	1	100
Розчин білка після діалізу	50,00±4,19	309±31	0,000	0,000	0,000	0,00	0,00
20 % насичення (NH ₄) ₂ SO ₄	10,00±0,93	36±4	903,3±89,3	25090,6±251,3	9033±891	1024,08	1,6
40 % насичення (NH ₄) ₂ SO ₄	11,50±0,92	134±12	801,9±84,2	5984,3±598,1	9221,9±934,0	244,3	6,7
60 % насичення (NH ₄) ₂ SO ₄	15,00±1,61	220±32	0,000	0,000	0,000	0,00	0,00
80 % насичення (NH ₄) ₂ SO ₄	36,00±3,38	4,0±3,4	709,7±68,6	177425,0±16222,4	25549,2±2555,0	6637,8	0,7

загальна активність також зросла у 16,5 рази, а процент виходу становив 6,7 %.

Подальше насичення білкового розчину сульфатом амонію до 60 % призводило до втрати активності Т-кінази, незважаючи на великий вміст білка, — 220 мг/мл. Щодо розподілу білка за фракціями, то його частка після 20 % насичення сульфатом амонію становила 11,7 %, після 40 % — 43,4 %, а при 60 % — 71,2 %. При 80 % насиченні сульфатом амонію зареєстровано найменший вміст білка, частка якого становила лише 1,3 %.

За 80 % насичення сульфатом амонію відносна активність ферменту практично не змінювалась, а питома активність і коефіцієнт очищення зросли у 2,8 разу порівняно з фракцією 40 % насичення сульфатом амонію. Порівнюючи 80 % насичення сульфатом амонію з вихідним білковим розчином, спостерігали зростання відносної та загальної активності у 45 разів, питомої активності та коефіцієнта очищення у 6637,7 разу, а процент виходу ферменту становив 0,7 %.

Аналіз розподілу за фракціями загальної активності ферменту показав, що 20,6 % її припадає на фракцію 20 % насичення сульфатом амонію, 21,1 % — на фракцію 40 % насичення сульфатом амонію та 58,3 % — на фракцію 80 % насичення сульфатом амонію.

Отже, діаліз і фракціонування сульфатом амонію призводять до розподілу білка і, власне, ферменту, залежно від його гідрофобності або гідрофільності. У тканині немалігнізованого міометрія було виявлено 3 фракції Т-кінази: гідрофобна, помірно гідрофобна та гідрофільна.

Діаліз білкового розчину доброякісної пухлини міометрія призводив до втрати активності досліджуваного ферменту, ймовірно, завдяки

інактивації ферменту під час діалізу (табл. 2). Втрата білка, порівняно з вихідним білковим розчином, становила 52 %. Подальше насичення білкового розчину сульфатом амонію до 20 % і 40 % насичення не приводило до появи активності ферменту. На цьому етапі білок за фракціями розподілявся таким чином: на 20 % насичення сульфатом амонію припадає 43,73 % білка, на 40 % — 11 % білка порівняно з білковим розчином після діалізу.

Подальше насичення сульфатом амонію до 60 % сприяло прояву активності ферменту: зростанню відносної активності у 15,2 разу, питомої активності та коефіцієнта очищення — у 41,6 разу, загальної активності — в 5,95 разу, процент виходу ферменту становив 14,3 % порівняно з розчином білка до діалізу.

Подальше насичення білкового розчину сульфатом амонію до 80 % призводило до втрати активності ферменту при найменшому (0,041 %) вмісті білка.

Таким чином, у процесі діалізу та поетапного фракціонування доброякісної пухлини спостерігали втрату активності Т-кінази: розчини білка після діалізу, за 20, 40 та 80 % насичення сульфатом амонію не проявляли ферментативної активності порівняно з білковим розчином до діалізу. Фракція 60 % насичення білкового розчину сульфатом амонію характеризувалася однією гідрофільною фракцією ферменту Т-кінази, імовірно, у процесі малігнізації відбуваються зміни електростатичних властивостей, внаслідок чого зменшується кількість фракцій ферменту з доброякісної пухлини.

Діаліз білкового розчину зі злоякісної пухлини міометрія призводив до втрати активності досліджуваного ферменту: у вихідному білковому розчині вона становила 11,2 нмоль тіамі-



**Фракціонування сульфатом амонію
тіамінпірофосфокінази доброякісної пухлини міометрія, $M \pm m$, $n=5$**

Етап виділення	Об'єм фракції (V), мл	Вміст білка, мг/мл	Відносна активність (ВА), нмоль тіаміну/г тканини за 1 хв	Питома активність, нмоль тіаміну/мг білка за 1 хв	Загальна активність, V · ВА	Коефіцієнт очищення	Вихід, %
Вихідний розчин білка	32,00±3,20	930±94	25,8±3,0	27,8±2,1	825,6±82,0	1	100
Розчин білка після діалізу	47,00±4,59	485±51	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
20 % насичення (NH ₄) ₂ SO ₄	9,00±0,92	36,3±3,5	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
40 % насичення (NH ₄) ₂ SO ₄	10,50±0,98	194±21	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
60 % насичення (NH ₄) ₂ SO ₄	12,50±1,21	340±33	393,3±41,0	1156,8±114,0	14459,6±1443,0	41,6	14,3
80 % насичення (NH ₄) ₂ SO ₄	63,50±6,38	0,20±0,03	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00

ну/г тканини за 1 хв, а після діалізу відбувалася інактивація ферменту (табл. 3). На цьому етапі втрата білка порівняно з вихідним білковим розчином сягнула 52 %. Подальше насичення білкового розчину сульфатом амонію до 20 % не спричинило прояву активності ферменту. На цьому етапі білок за фракціями розподілявся таким чином: на фракцію 20 % насичення сульфатом амонію припадає 9,8 % білка, на фракцію 40 % насичення сульфатом амонію — 52,5 %, на фракцію 60 % насичення сульфатом амонію — 64,9 %, а фракція 80 % насичення сульфатом амонію характеризувалася найменшим вмістом білка, частка якого становила лише 1,13 % порівняно з білковим розчином після діалізу.

Отже, фракціонування сульфатом амонію при 60 % насиченні сприяло проявам активності ферменту: зростанню відносної активності у 19,2 разу, питомої активності та коефіцієнта очищення — у 70,4 разу, загальної активності — у 3,7 разу, а процент виходу ферменту становив 7,6 %, порівняно з розчином білка до діалізу.

Подальше насичення білкового розчину сульфатом амонію до 80 % призводило до втрати активності ферменту. Частка білка за 80 % насичення сульфатом амонію становила лише 1,1 %.

Таким чином, у процесі діалізу та поетапного фракціонування тканини міометрія зі злоякісним новоутворенням характеризувалися втратою активності ферменту: розчини білка після діалізу, при 20, 60 та 80 % насиченні сульфа-

Таблиця 3

**Фракціонування сульфатом амонію
тіамінпірофосфокінази злоякісної пухлини міометрія, $M \pm m$, $n=5$**

Етап виділення	Об'єм фракції (V), мл	Вміст білка, мг/мл	Відносна активність (ВА), нмоль тіаміну/г тканини за 1 хв	Питома активність, нмоль тіаміну/мг білка за 1 хв	Загальна активність, V · ВА	Коефіцієнт очищення	Вихід, %
Вихідний розчин білка	39,00±3,20	686±64	11,2±1,3	16,4±1,8	639,6±62,0	1	100
Розчин білка після діалізу	59,00±4,19	354,0±35,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20 % насичення (NH ₄) ₂ SO ₄	10,00±0,97	35,0±3,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
40 % насичення (NH ₄) ₂ SO ₄	11,00±1,02	186,0±18,9	214,9±24,0	1156,7±114,0	2363,7±237,0	70,6	7,6
60 % насичення (NH ₄) ₂ SO ₄	13,50±1,41	230±21	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
80 % насичення (NH ₄) ₂ SO ₄	58,00±5,38	4,0±0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0



том амонію не мали ферментативної активності. За 40 % насичення білкового розчину сульфатом амонію встановлена одна гідрофобна фракція ферменту Т-кінази — імовірно, у процесі малігнізації відбуваються зміни електростатичних властивостей, внаслідок чого зменшується кількість фракцій ферменту зі злоякісної пухлини.

Дані літератури свідчать про те, що Т-кіназа як індивідуальний білок може бути отримана з білкового розчину печінки щурів за 60 % насичення його сульфатом амонію [2]. Однак нами встановлено, що поетапне фракціонування призводить до більш чіткого розділення та сприяє отриманню високоочищених індивідуальних форм Т-кінази з високою питомою активністю ферменту.

З наведеного видно, що метод поетапного фракціонування сприяє іммобілізації Т-кінази, що призводить до конформаційних змін, які підвищують активність і стабільність ферменту, що було показано іншими дослідниками для інших ферментів [13; 14].

Висновки

1. Метод поетапного фракціонування сприяє іммобілізації Т-кінази, яка призводить до конформаційних змін, що підвищують активність і стабільність ферменту.

2. Процес малігнізації міометрія призводить до зменшення кількості фракцій ферменту: з трьох фракцій — у немалігнізованій тканині до однієї фракції — у доброякісному та злоякісному новоутвореннях міометрія.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Взаємодія* тіамінкінази мозку щурів із тіаміном та його похідними / С. Ю. Пилипчук, Ю. М. Пархоменко, З. С. Протасова [та ін.] // Український біохімічний журнал. — 2001. — Т. 73, № 2. — С. 51–56.
2. *Протасова З. С.* Взаимодействие тиамин с синапсомозга крыс / З. С. Протасова, Ю. М. Пархоменко, Г. В. Донченко // Український біохімічний журнал. — 1999. — Т. 71, № 4. — С. 50–57.
3. *Deus B.* Subcellular distribution of thiamine pyrophosphokinase activity in rat liver and erythrocytes / B. Deus, N. Blum // *Biochem. Biophys. Acta.* — 1970. — Vol. 219, N 2. — P. 489–492.
4. *Singleton C. K.* Molecular mechanisms of thiamine utilization / C. K. Singleton, P. R. Martin // *Curr. Mol. Med.* — 2001. — Vol. 1, N 2. — P. 197–207.
5. *Voskoboev A. I.* Isolation and basic properties of thiamine pyrophosphokinase from brewing yeast / A. I. Voskoboev, I. P. Chernikevich, Y. M. Ostrovsky // *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* — 1975. — Vol. 11, N 2. — P. 230–236.
6. *Staneva-Dobrovski L.* Thiamine pyrophosphatase cytochemistry in rat endometrium during the oestrous cycle / L. Staneva-Dobrovski // *Histochemistry.* — 1994. — Vol. 102, N 2. — P. 129–144.
7. *Kiessling K. H.* Thiamine diphosphate in growing tissues. I. Thiamine diphosphate in normal and malignant tissues / K. H. Kiessling // *Exp. Cell. Res.* — 1961. — N 2. — P. 311–319.

8. *Требухина Р. В.* Особенности метаболизма тиамин в организме при росте злокачественных опухолей : автореф. дис. на соискание ученой степени д-ра биол. наук / Р. В. Требухина. — Минск, 1984. — 32 с.

9. *Всемирная организация здравоохранения* // Материалы ежегодных отчетов. — СПб., 1981. — 286 с.

10. *Елисеєва Г. Д.* Флуориметрическое определение тиамин, кокарбоксилазы и рибофлавина в биологических объектах / Г. Д. Елисеєва // *Витамины.* — 1953. — Т. 1. — С. 38–57.

11. *Protein measurement with the Folin phenol reagent* / O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, F. Z. Farr, L. J. Randal // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265–275.

12. *Рокицкий П. Ф.* Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. — Минск : Высш. школа, 1967. — 326 с.

13. *Шварцман А. Л.* О структуре и функциях гексокиназы в раковых клетках человека : автореф. дис. ... канд. биол. наук / А. Л. Шварцман. — Л., 1975. — 28 с.

14. *Тривен М.* Иммуобилизованные ферменты / М. Тривен. — М. : Мир, 1983. — 213 с.

REFERENCES

1. Pilipchuk S.Yu., Parkhomenko Yu.M., Protasova Z.S. et al. Interaction of thiamine kinase of brain in rats with thiamine and its derivatives. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2001; 73, 2: 51-56.
2. Protasova Z.S., Parkhomenko Yu.M., Donchenko G.V. Interaction of thiamine of brain in rats with synaptosomes. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 1999; 71, 4: 50-57.
3. Deus B., Blum N. Subcellular distribution of thiamine pyrophosphokinase activity in rat liver and erythrocytes. *Biochem. Biophys. Acta.* 1970; 219, 2: 489-492.
4. Singleton C.K., Martin P.R. Molecular mechanisms of thiamine utilization. *Curr. Mol. Med.* 2001; 1, 2: 197-207.
5. Voskoboev A.I., Chernikevich I.P., Ostrovsky Y.M. Isolation and basic properties of thiamine pyrophosphokinase from brewing yeast. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 1975; 11, 2: 230-236.
6. Staneva-Dobrovski L. Thiamine pyrophosphatase cytochemistry in rat endometrium during the oestrous cycle. *Histochemistry* 1994; 102, 2: 129-144.
7. Kiessling K.H. Thiamine diphosphate in growing tissues. I. Thiamine diphosphate in normal and malignant tissues. *Exp. Cell. Res.* 1961; 2: 311-319.
8. Trebukhina R.V. Peculiarities of thiamine metabolism with growth of malignant tumors. Avtoref. dis. ... d. biol. nauk. Minsk, 1984: 32.
9. Vsemirnaya Organizatsiya Zdravookhraneniya. *Materialy ezhegodnykh otchetov.* Sankt-Peterburg, 1981: 286.
10. Yeliseyeva G.D. Fluorimetric determination of thiamine, cocarboxilase i riboflavin in biological objects. *Vitaminy* 1953; 1: 38-57.
11. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr F.Z., Randal L.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
12. Rokitskiy P.F. Biologic statistics. Minsk, Vyssh. shkola, 1967: 326.
13. Shvartsman A.L. About structure and functions of hexokinase. — Avtoref. ... diss. kand. biol. nauk. Leningrad, 1975: 28.
14. Triven M. Immobilized enzymes. M., Mir, 1983: 213.

Надійшла 4.07.2012

