

СВЯЗЫВАНИЕ АРОМАТИЧЕСКИХ ЛИГАНДОВ С ДНК В ПРИСУТСТВИИ ВИТАМИНА

Представлены результаты исследования совместного связывания антиопухолевых антибиотиков: дауномицина, ногаламицина, актиномицина D и новатрона, а также фенантридинового красителя бромистого этидия и акридинового красителя профлавина с дезоксирибонуклеотидом 5'-d(TrGpCpA)₂ в присутствии витамина флавиноманонуклеотида в водном растворе. Предложена модель анализа конкурентного связывания; сформулирован критерий, позволяющий разделить процессы гетероассоциации витамина с исследуемыми ароматическими молекулами и комплексообразования витамина с ДНК.

Введение. В настоящее время для лечения многих видов злокачественных раковых образований используются различные ароматические препараты, среди которых наиболее распространенными являются ароматические антибиотики актиномицин D (AMD), митоксантрон или новатрон (NOV), антрациклиновые антибиотики и др.

Антиопухолевый антибиотик актиномицин D (рисунок 1, а), применяется при лечении опухоли Вильмса (эмбриональная нефрома), лимфосаркоме, тератобластоме, саркоме яичка и др., при этом образуется устойчивый комплекс ДНК, что вызывает нарушение ДНК-зависимого синтеза РНК вследствие подавления РНК-полимеразы. AMD является токсичным антибиотиком, при лечении могут наблюдаться угнетение кроветворения, поражения желудочно-кишечного тракта.

Антрациклиновые антибиотики – группа нековалентно интеркалирующих в ДНК агентов, которые нашли широкое применение в клинической практике для лечения многих типов твердотельных опухолей и лейкемии. К данной группе антибиотиков принадлежат такие ароматические вещества как дауномицин (DAU) (рисунок 1, б), доксорубин (DOX) и ногаламицин (NOG) (рисунок 1, в). Однако применение антрациклинов ограничено из-за их высокой токсичности. Так к наиболее серьезным побочным эффектам, возникающим при применении DOX/DAU можно отнести острую кардиотоксичность, которая на поздних стадиях приводит к необратимому закупориванию сердечных сосудов. Из-за большой значимости антрациклиновых антибиотиков в химиотерапии много усилий было затрачено на снижение побочных эффектов, возникающих при их применении.

Антибиотик митоксантрон или новатрон (NOV) (рисунок 1, г) используется в клинической практике как эффективное средство при лечении рака молочной железы, лейкемии и лимфолейкоза. Считается, что фармакологическое действие новатрона связано с его интеркаляцией в ДНК и ингибированием синтеза ДНК и РНК. Новатрон обладает меньшей, чем антрациклиновые антибиотики, противоопухолевой активностью, но его побочные эффекты кардиотоксичности по сравнению с антрациклинами существенно снижены.

Таким образом, одним из главных лимитирующих факторов использования антиопухолевых антибиотиков является их высокая побочная токсичность.

Ранее было показано, что токсичность антибиотика антрациклинового ряда доксорубина снижается в присутствии рибофлавина (витамина В₂) и его производного флавиноманонуклеотида (FMN, рисунок 1, д). Было предложено несколько механизмов взаимодействия DOX с витамином, включающих образование бимолекулярных комплексов с последующей химической деградацией антибиотика, а также способность DOX и некоторых его метаболитов подражать флавином и успешно конкурировать за сайты связывания на флавиносодержащих ферментах. Поскольку биологическое действие рассмотренных выше ароматических антибиотиков связано с их способностью взаимодействовать с ядерной ДНК, то можно предположить, что витамин В₂ и его производные могут препятствовать связыванию ароматических антибиотиков с ДНК. Ранее было обнаружено протекторное действие рибофлавина по отношению к ДНК [1], выражающееся в значительном уменьшении связывания ароматических мутагенов с нуклеиновой кислотой в присутствии витамина. Кроме этого была доказана способность других ароматических веществ, таких как кофеин, перехватывать молекулы антибиотиков и мутагенов посредством гетероассоциации и конкурировать с ними за места связывания с ДНК [2,3]. Таким образом, можно сделать вывод, что, как связывание витамина с ДНК, так и гетероассоциация антибиотиков и мутагенов с витамином В₂ могут давать вклад в наблюдаемое изменение токсичности фармацевтических препаратов в присутствии рибофлавина. Следовательно для понимания механизма действия витамина В₂ и его производных на ароматические биологически активные соединения представляет интерес количественный анализ каждого из процессов: гетероассоциации ароматических веществ и конкуренции витамина и ароматического препарата за места посадки на ДНК.

Для исследования процесса совместного связывания ароматического антибиотика/красителя и витамина В₂ с ДНК необходимо знать их равновесные параметры само-, гетероассоциации и комплексообразования с ДНК. Подобные исследования могут быть проведены независимо в одинаковых условиях растворителя, а полученные равновесные константы могут быть использованы для расчета относительного вклада процессов гетероассоциации и комплексообразования. В работе [4] нами было показано, что адекватной моделью ДНК для исследований подобного рода является олигомерная тетра-нуклеотидная последовательность 5'-d(TrGpCpA). В связи с этим, в настоящей работе было проведено исследование совместного свя

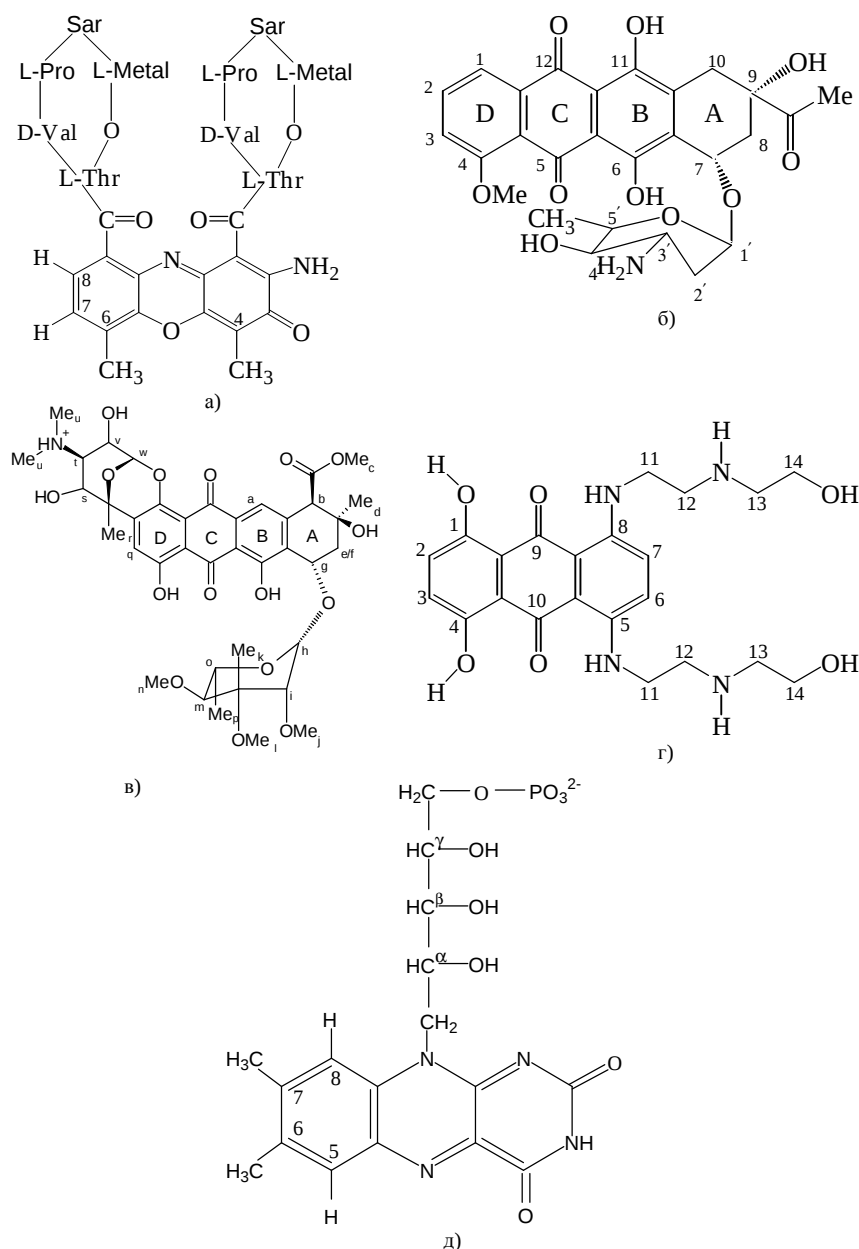


Рисунок 1 - Структурные формулы молекул актиномицина D (а), дауномицина (б), ногаламицина (в), новатрона (г) и флавин-моноклеотида (д)

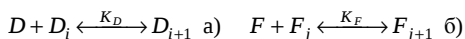
звания антиопухолевых антибиотиков дауномицина, ногаламицина, актиномицина D и новатрона, а также фенантридинового красителя бромистого этидия и акридинового красителя профлавина с дезоксирибонуклеотидом 5'-d(TrGrCpA)₂ в присутствии FMN в водном растворе. Равновесные параметры самоассоциации, гетероассоциации и комплексообразования антиопухолевых антибиотиков, красителей и FMN с d(TGCA)₂ были определены ранее в одинаковых условиях растворителя [4 и ссылки в ней]. Предложена модель анализа конкурентного связывания; сформулирован критерий, позволяющий разделить процессы гетероассоциации FMN с исследуемыми ароматическими молекулами и комплексообразования FMN с ДНК.

Результаты и обсуждение

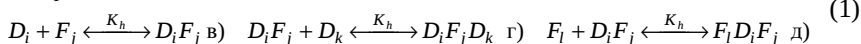
Модель совместного связывания витамина с ароматическими лигандами и ДНК.

Для анализа совместного связывания антиопухолевых антибиотиков/красителей и FMN с дезокситетрануклеотидом использовалась обобщенная схема (1), включающая реакции ассоциации и комплексообразования исследуемых веществ, а также их комплексообразования с ДНК [4].

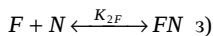
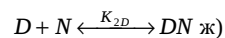
Самоассоциация :



Гетероассоциация :



Комплексообразование :



где K_D , K_F – константы самоассоциации лиганда и FMN, соответственно K_h – константа гетероассоциации лиганда с FMN; K_{2D} , K_{2F} – константы комплексообразования лиганда и FMN с d(TGCA)₂. В сводной таблице 1 представлены значения всех используемых равновесных констант, определенных ранее.

Таблица 1 – Равновесные константы ассоциации (K_D , K_F , K_h , л/моль) и комплексообразования с тетрамером (K_{2D} , K_{2F} , л/моль) лиганда (D) и витамина (F)

Лиганд	K_D, K_F	K_h	K_{2D}, K_{2F}
DAU	720	450	560000
NOV	27300	40400	850000
NOG	7200	965	1200000
AMD	1420	890	1000000
EB	305	640	72000
PF	700	920	15000
FMN	265	-	8000

Модель трехкомпонентной равновесной смеси (схема (1)) содержит все типы взаимодействий в растворе, а именно, самоассоциацию лиганда (D), т.е. DAU, NOG, NOV, AMD, EB и PF, (1а) и FMN (F) (1б); гетероассоциацию лиганда с FMN (1в-1д) и комплексообразование лиганда/FMN с дуплексной (N) формой тетрамера в водном растворе (1ж-1з). В работе [4] было показано, что адекватное моделирование совместного связывания двух лигандов с ДНК должно проводиться только по отношению к дуплексной форме тетрамера в растворе.

Каждая реакция в схеме (1) вносит свой вклад в закон сохранения масс, представленный уравнением (2):

$$\begin{cases} \frac{D}{(1-K_D D)^2} \left(1 + \frac{K_h F}{1-K_F F} + \frac{K_h^2 F^2}{2(1-K_F F)^2} + \frac{K_h^2 F D}{(1-K_F F)(1-K_D D)} \right) + K_{2D} D N = D_0 \\ \frac{F}{(1-K_F F)^2} \left(1 + \frac{K_h D}{1-K_D D} + \frac{K_h^2 D^2}{2(1-K_D D)^2} + \frac{K_h^2 F D}{(1-K_F F)(1-K_D D)} \right) + K_{2F} F N = F_0 \\ N(1 + K_{2D} D + K_{2F} F) = N_0 \end{cases} \quad (2)$$

где D_0 , F_0 , N_0 и D , F , N – общие и мономерные концентрации лиганда, FMN и d(TGCA)₂, соответственно

Из уравнений (2) следует, что соответствующие выражения для лиганда и для FMN могут быть получены друг из друга путем замены символов D на F и наоборот, F на D . Это следует из симметрии схемы реакций (1) по отношению к взаимодействующим ароматическим соединениям D и F в растворе. Члены, ответственные за самоассоциацию в схеме (2) соответствуют бесконечномерной некооперативной самоассоциации обоих веществ, члены, определяющие гетероассоциацию, взяты из обобщенной модели гетероассоциации молекул [5], а члены, ответственные за комплексообразование с ДНК – из [3,6].

Формулировка критерия для разделения процессов гетероассоциации и комплексообразования с ДНК.

Существует два основных молекулярных процесса, влияющих на уменьшение связывания ароматического соединения X с ДНК в присутствии другого ароматического соединения Y – гетероассоциация X–Y и комплексообразование Y с ДНК [3]. Гетероассоциация уменьшает количество мономеров X в растворе, способных связываться с ДНК – этот процесс называется "интерцепторным" действием Y по отношению к X [2,3]. Комплексообразование Y с ДНК частично вытесняет молекулы X, связанные с ДНК, уменьшая тем самым долю комплексов X–ДНК – этот процесс называется "протекторным" действием Y по отношению к ДНК [1,3]. В любом случае доля комплексов X – ДНК снижается в присутствии Y и, следовательно, изменяется биологическая активность вещества X.

Наиболее простым способом разделения двух процессов является подсчет доли молекул X в гетерокомплексах (f_h) и в комплексах с ДНК (f_{C2}), и затем сравнение их, как это было сделано ранее [3]. Однако, как f_h , так и f_{C2} получаются из решения системы уравнений (2) и, таким образом, являются зависимыми от обоих процессов комплексообразования и гетероассоциации. Это означает, что величины f_h и f_{C2} являются взаимозависимыми, и действительное разделение двух процессов при таком подходе не

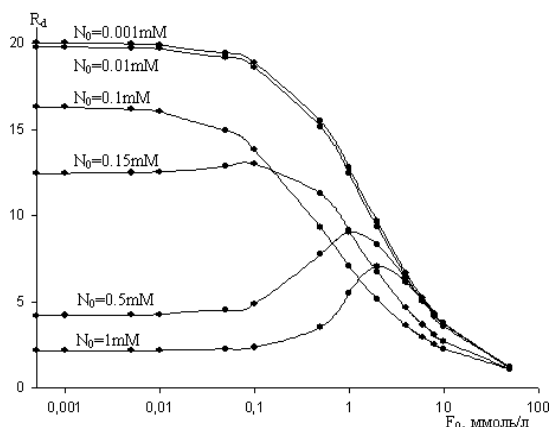


Рисунок 2 – Относительное уменьшение связывания DАU ($D_0=0.01$ ммоль/л) с $d(TGCA)_2$ (R_d), как функция концентрации FMN (F_0) при изменении концентрации тетрамера (N_0)

представляется возможным и может привести к ошибочным результатам. Искомый критерий должен оперировать с f_h и f_{C2} в их "чистой" форме, не содержащей вклада от другого процесса.

Для оценки влияния процессов гетероассоциации (интерцепторное действие FMN) и комплексообразования с ДНК (протекторное действие FMN) на способность исследуемых ароматических соединений образовывать комплексы с ДНК в присутствии витамина, был произведен расчет относительного снижения доли комплексов лиганд (D)- $d(TGCA)_2$ в двух случаях: при "отключенной" гетероассоциации и "включенном" комплексообразовании FMN с $d(TGCA)_2$ ($K_h=0$, $K_{2F}\neq 0$) – $f_{C2(C)}^D$, и, при "включенной" гетероассоциации и "отключенном" комплексообразовании FMN с $d(TGCA)_2$ ($K_h\neq 0$, $K_{2F}=0$) – $f_{C2(H)}^D$:

$$R_d = \frac{f_{C2(0)}^D - f_{C2(C)}^D}{f_{C2(0)}^D - f_{C2(H)}^D}, \quad (3)$$

где $f_{C2(0)}^D$ – мольная доля комплексов лиганд- $d(TGCA)_2$ при "отключенных" гетероассоциации и комплексообразовании

Область $R_d > 1$ соответствует преобладанию процесса комплексообразования FMN-ДНК над процессом гетероассоциации лиганд -FMN (протекторное действие FMN), а в области $R_d < 1$ главный вклад в уменьшение доли комплексов лиганд-ДНК вносит процесс гетероассоциации (интерцепторное действие FMN).

В качестве примера на рисунке 2 представлен график относительного уменьшения связывания DАU с $d(TGCA)_2$ рассчитанный в широкой области концентраций FMN, при постоянной концентрации DАU ($D_0 = 0.01$ ммоль/л).

Из рисунка 2 видно, что уменьшение концентрации тетрамера N_0 в смешанном растворе приводит к постепенному увеличению максимума исследуемой зависимости и сдвигу его в область малых концентраций флавин-моноклеотида что обусловлено более ранним насыщением тетрамера молекулами как витамина, так и антибиотика и приводящим к доминированию протекторного действия в микромолярной области концентраций FMN. В то же время при $N_0 \gg D_0$ и $F_0 < 0,1$ ммоль/л любое добавление FMN в раствор приводит к преимущественному связыванию витамина со свободными от лиганда тетрануклеотидами, имеющимися в избытке, что выражается в соизмеримости вклада протекторного и интерцепторного механизмов в указанной области концентраций.

Исходя из общего вида полученных зависимостей (рисунок 2), процесс вытеснения молекулы лиганда из ДНК можно разделить на две фазы в зависимости от концентрации ДНК в смешанном растворе: фаза 1 (без выраженного максимума) – при соизмеримых концентрациях ДНК и лиганда: $N_0 \sim D_0 = 0.01$ ммоль/л; фаза 2 (с выраженным максимумом) – при концентрациях ДНК больших по сравнению с концентрацией лиганда: $N_0 \gg D_0$. В пределах каждой фазы R_d мало зависит как от N_0 , так и от F_0 в области малых концентраций FMN (до 100 мкмоль/л).

На рисунке 3 представлен сравнительный график относительного уменьшения связывания антиопухолевых антибиотиков (DAU, NOV, NOG, AMD) и красителей (EB, PF) с $d(TGCA)_2$ рассчитанный в широком диапазоне концентраций FMN, при постоянных концентрациях лиганда и тетрамера в фазе 1 (рисунок 3, а) и в фазе 2 (рисунок 3, б).

Из рисунка 3 следует, что для системы FMN-NOV интерцепторное действие витамина является доминирующим в обеих фазах и при любых концентрациях FMN. Для всех остальных ароматических лигандов в физиологическом диапазоне концентраций FMN < 0.1 ммоль/л наблюдается соизмеримость протекторного и интерцепторного механизмов только в фазе 2. При этом в фазе 1 протекторное действие является преобладающим.

Интересен тот факт, что последовательность расположения лигандов на графике 3 и значение R_d остаются фактически неизменными в обеих фазах при изменении начальной концентрации лиганда (D_0) в широком диапазоне. Так, изменение концентрации лиганда на порядок приводит лишь к небольшому 10% отклонению графика зависимости в каждой точке при малых концентрациях FMN. Кроме этого, из рисунка 3 следует, что в физиологическом диапазоне концентраций FMN зависимость R_d от F_0 и N_0 в обеих фазах также мала, это дает возможность подобрать аппроксимирующие выражения для R_d в области физиологического диапазона концентраций FMN ($< 0,1$ ммоль/л) в двух фазах. Получены следующие соотношения для фазы 1: $R_d = 8000/K_h$; для фазы 2: $R_d = 1000/K_h$. При этом корреляции с K_{2D} – константой комплексообразования лиганда с ДНК – не наблюдалось. Таким образом, полученные приближенные фор-

мулы позволяют предсказать по известной величине K_h доминирующий процесс при совместном связывании исследуемого лиганда с ДНК в присутствии FMN в физиологическом диапазоне концентраций.

Для оценки процента вытесненного из ДНК лиганда при добавлении FMN предлагается следующий критерий:

$$A_d = \frac{f_{C2(0)}^D - f_{C2}^D}{f_{C2(0)}^D}, \quad (4)$$

где $f_{C2(0)}^D$ – мольная доля комплексов лиганд-д(TGCA)₂ при "отключенной" гетероассоциации и комплексообразовании, f_{C2}^D – мольная доля комплексов лиганд-д(TGCA)₂ при "включенной" гетероассоциации и "включенном" комплексообразовании FMN с д(TGCA)₂ ($K_h \neq 0$, $K_{2F} \neq 0$). Полученные зависимости A_d для исследуемых ароматических молекул представлены на рисунке 4,а для фазы 1, на рисунке 4,б для фазы 2.

Анализ полученных зависимостей позволяет сделать следующие выводы. При добавлении флавин-мононуклеотида в смешанный раствор лиганда с ДНК наблюдается рост процента вытесненного лиганда, с характеристическим насыщением вблизи 100%. Для обеих фаз, т.е. для различных значений начальных концентраций ДНК, характерна одинаковая последовательность расположения лигандов по фактору A_d ; при этом в фазе 1, по сравнению с фазой 2, при одинаковых концентрациях FMN процент вытесненного лиганда больше, что объясняется меньшей по сравнению с фазой 2 концентрацией ДНК. Поскольку последовательность веществ (от NOV к DAU) не зависит от концентрации ДНК, лиганда и витамина, следовательно для нее можно подобрать аппроксимирующее выражение, описывающее последовательность веществ по уменьшению фактора A_d . Наилучшая аппроксимация последовательности веществ задается параметром K^2_h/K_c , который можно отождествить с фактором выживаемости клеток LC_{50} для заданного лиганда в присутствии рибофлавина.

Биологическое соответствие полученных результатов.

В настоящей работе для моделирования совместного связывания двух ароматических соединений с

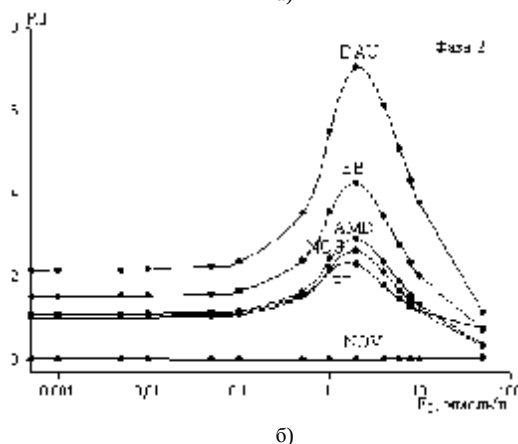
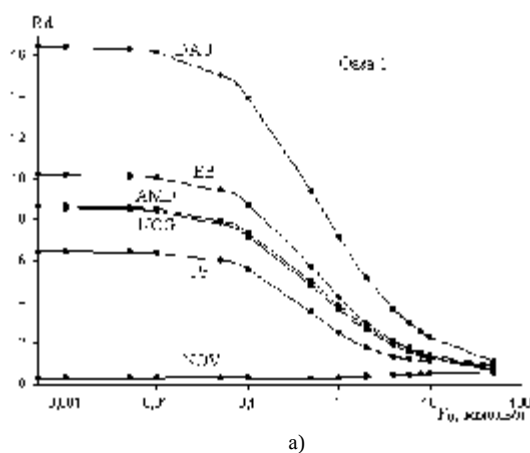


Рисунок 3 - Относительное уменьшение связывания drug с д(TGCA)₂ (A_d), как функция концентрации FMN ($D_0=0.01$ ммоль/л; $N_0=0.01$ ммоль/л в фазе 1 и $N_0=1$ ммоль/л в фазе 2)

ДНК были использованы результаты ЯМР эксперимента, выполненные ранее в единых условиях растворителя, соответствующих стандартным физиологическим условиям (буферизованный водный раствор, 0.1M Na⁺, pH 7.1, T=298K). В связи с этим можно предполагать, что равновесные константы ассоциации и комплексообразования использованные для расчета, (или, по крайней мере, их соотношения) близки к таковым в клеточных условиях.

Наиболее существенным в вопросе о соответствии результатов моделирования клеточным условиям является правильность выбора концентраций взаимодействующих веществ. Концентрация витамина в настоящем исследовании варьировалась в широком диапазоне от 0 до 100 ммоль/л, однако анализ совместного связывания был преимущественно сосредоточен на диапазоне $F_0 = 0 \dots 100$ ммоль/л, являющемся физиологическим. Концентрация лиганда во всех проведенных выше расчетах была выбрана равной $D_0 = 10$ ммоль/л, что несколько превышает пиковую концентрацию типичного антрациклинового антибиотика в плазме крови при стандартном режиме химиотерапии. Для антрациклинов, а также многих других биологически активных соединений, воздействующих на внутриклеточные рецепторы, наблюдается эффект накопления препарата в клетках организма, что приводит к многократному превышению внутриклеточной концентра

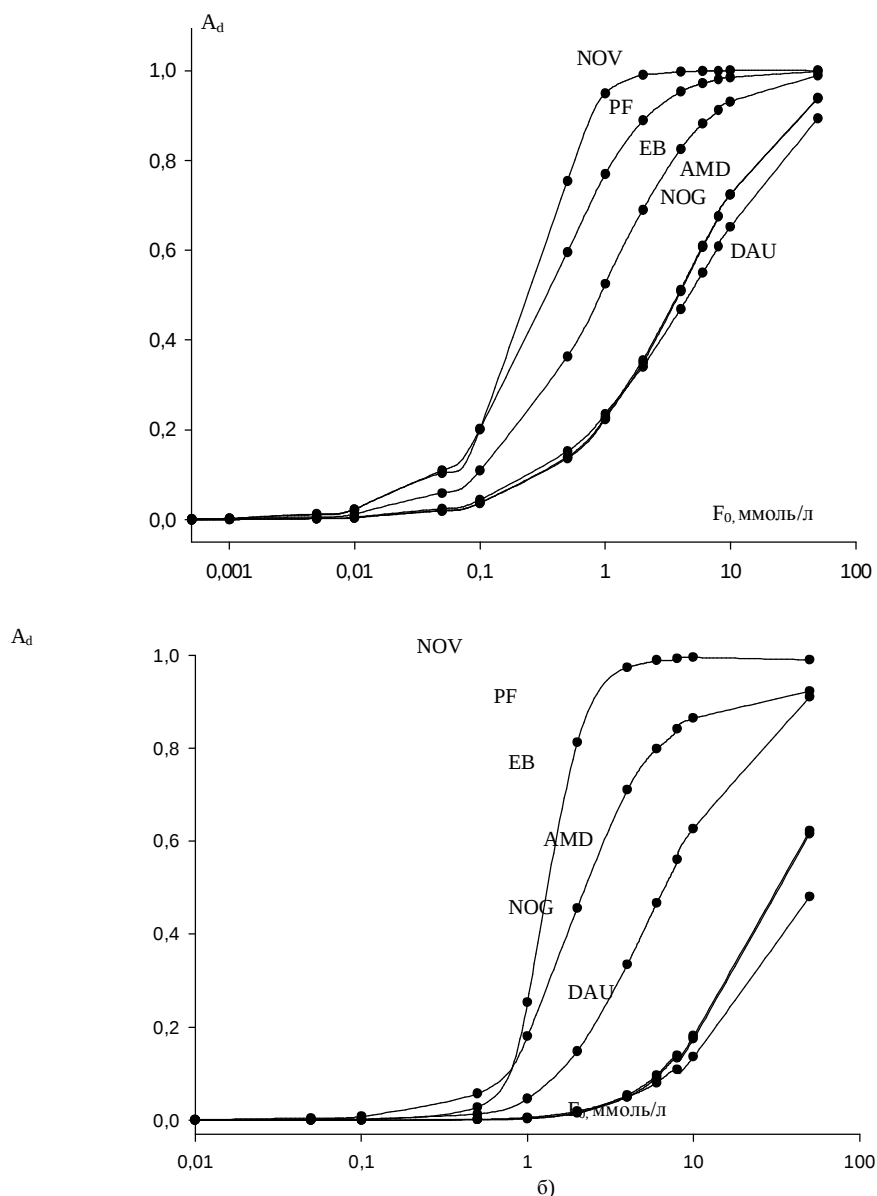


Рисунок 4 – Процент вытесненного лиганда из $d(TGCA)_2$ (A_d), как функция концентрации FMN; а) для фазы 1 ($D_0=0.01$ ммоль/л, $N_0=0.01$ ммоль/л), б) для фазы 2 ($D_0=0.01$ ммоль/л, $N_0=1$ ммоль/л)

ции препарата по сравнению с его концентрацией в плазме. В частности, для новатрона эксперименты *in vivo* свидетельствуют о 200-300-кратном превышении внутриклеточной концентрации антибиотика, по сравнению с концентрацией в кровяной плазме [7].

Вопрос с клеточной концентрацией ДНК является наименее определенным. В настоящей работе использовался модельный тетра nukлеотид, причем под его концентрацией (N_0) понималась концентрация свободных от белков тетрамерных участков ядерной ДНК в хроматине. Оценка этой величины затруднительна, однако, из приведенного выше расчета (рисунок 4, б) следует, что при $N_0 > 1$ ммоль/л протекторно-интерцепторное действие даже при высоких концентрациях FMN ($F_0 = 1$ ммоль/л) становится незначительным ($< 20\%$). При этом известное из литературы снижение токсичности ароматических препаратов в присутствии витамина составляет порядок нескольких десятков процентов [8]. Это дает основание предполагать, что физиологически адекватный диапазон концентраций ДНК имеет порядок ммоль/л и менее. В настоящей работе нами использовались два значения концентрации тетрамера – 0.01 ммоль/л и 1 ммоль/л – соответствующие двум характерным фазам равновесного связывания лиганда и витамина с ДНК. Известно, что плотность упаковки ядерного хроматина существенно зависит от фазы клеточного цикла, например, при инициации деления клетки ДНК частично “оголяется”, освобождаясь от гистонов. Можно предположить, что Фаза 2 в настоящем исследовании ($N_0 = 1$ ммоль/л) наиболее соответствует фазе деления клетки, а Фаза 1 ($N_0 = 0.01$ ммоль/л) – стабильному состоянию клетки.

Выводы.

В данной работе предложена модель совместного связывания ароматического лиганда и витамина B_2 с клеточной ДНК. Предложен критерий для разделения интерцепторного и протекторного механизмов действия витамина на связывание лиганда с ДНК (R_d), а также фактор A_d , позволяющий дать

количественную оценку воздействия витамина на связывание лиганда с ДНК. Проанализировано влияние концентраций лиганда, витамина и ДНК на факторы R_d и A_d . Показано, что в физиологическом диапазоне концентраций молекулярных компонент существует две фазы равновесного связывания лиганда с ДНК в присутствии витамина – фаза 1 ($N_0 \sim D_0$) и фаза 2 ($N_0 \gg D_0$) – в которых факторы R_d и A_d несильно зависят от концентрации лиганда, витамина и ДНК. Это дало возможность подобрать аппроксимирующие выражения для расчета R_d и A_d (в относительных единицах) в обеих фазах. Таким образом, если основным механизмом действия витамина B_2 на данный ароматический препарат является протекторное (конкуренция за места посадки на ДНК) и интерцепторное (гетероассоциация) действие, то результаты настоящей работы позволяют предсказать относительное снижение токсичности лиганда в присутствии витамина и указать доминирующий молекулярный процесс, ответственный за это.

Библиографический список

1. Pangrekar J. Effects of riboflavin deficiency and riboflavin administration on carcinogen-DNA binding / J. Pangrekar, K. Krishnaswamy, V. Jagadeesan // *Fd. Chem. Toxic.* — 1993. — V. 31. — P. 745 – 750.
2. Spectroscopic and molecular modeling studies of caffeine complexes with DNA intercalators / R.W. Larsen, R. Jasuja, R.K. Hetzler, P.T. Muraoka et al. // *Biophys. J.* — 1996. — V. 70. — P. 443 – 452.
3. Hetero-association of caffeine and aromatic drugs and their competitive binding with a DNA oligomer / D.B. Davies, D.A. Veselkov, L.N. Djimant, A.N. Veselkov // *Eur. Biophys. J.* — 2001. — V. 30. — P. 354 – 366.
4. Davies D.B. Binding of anthracycline antibiotic with DNA in the presence of aromatic vitamin / D.B. Davies, M.P. Evstigneev, Yu.V. Mukhina // *Biophys. Chem.* — 2005. — V. 50. — P. 153 – 163.
5. ^1H NMR investigation of the hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution: factors involved in the stabilization of complexes of daunomycin and acridine drugs / D.B. Davies, D.A. Veselkov, V.V. Kodintsev, M.P. Evstigneev, A.N. Veselkov // *Mol. Phys.* — 2000. — V. 98. — N 23. — P. 1961 – 1971.
6. NMR investigation of the complexation of daunomycin with deoxytetranucleotides of different base sequence in aqueous solution / D.B. Davies, R.J. Eaton, S.F. Baranovsky, A.N. Veselkov // *J. Biomol. Str. Dyn.* — 2000. — V. 17. — N5. — P. 887 – 901.
7. Intracellular concentrations of mitoxantrone in leukemic cells in vitro vs in vivo / B. Sundman-Engberg, U. Tidefelt, A. Gruber, C. Paul // *Leukemia Res.* — 1993. — V. 17. — P. 347 – 352.
8. Mechanism of the inhibition of mutagenicity of a benzo[a]pyrene 7,8-diol 9,10-epoxide by riboflavine 5'-phosphate / A.W. Wood, J.M. Sayer, H.L. Newmark et al // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1982. — V. 79. — P. 5122 – 5126.

Поступила в редакцию 19.01.2005 г.