



УДК 577.12:616-831-005.4-73.584.092.9

ДИНАМИКА УРОВНЕЙ МАКРОЭРГИЧЕСКИХ ФОСФАТОВ МОЗГА ВО ВРЕМЯ ИШЕМИИ ПО ДАННЫМ [³¹P]ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ

ЛИХОДИИ С. Ст., ЛИХОДИИ Ст. С., СИБЕЛЬДИНА Л. А., СЕМЕНОВА Н. А.

Институт химической физики АН СССР, Москва;
*Государственный медицинский институт, Целиноград

Для приближенной регистрации методом [³¹P]ЯМР фосфорсодержащих метаболитов мозга крысы разработан датчик с поверхностной катушкой, отличающийся высокой пространственной избирательностью и чувствительностью, что позволило существенно сократить время на получение [³¹P]ЯМР спектра мозга крысы *in vivo* (до 30—60с) и исследовать тем самым динамику быстротекающих энергетических процессов в ткани мозга.

Изучена динамика изменений фосфорных метаболитов мозга крыс в течение 30 мин полной ишемии. Зарегистрировано быстрое снижение макроэргических фосфатов мозга, рост уровня P_i и фосфомоноэфиров с одновременным развитием внутриклеточного ацидоза. Установлен бифазный характер снижения уровней креатинфосфата и АТР. Обсуждены возможные механизмы выявленных особенностей изменения уровней макроэргов.

Нарушение энергетического метаболизма является важным процессом ишемии головного мозга, которое определяет развитие патологических механизмов клеточного повреждения, связанных с нарушением ионотранспортных функций, деградацией мембранных фосфолипидов, активацией свободнорадикальных процессов [1, 2].

Несмотря на многочисленные исследования, посвященные влиянию ишемии на уровни макроэргических фосфатов мозга, основанные на использовании физико-химических методов, в том числе ЯМР спектроскопии [3—5], в литературе приводятся часто плохо согласующиеся друг с другом показатели энергетического метаболизма и данные о темпах изменений уровней макроэргов в динамике ишемии.

Так, по данным Wimp и соавт. [3], в мозгу крыс уже в первые 60 с ишемии на 60% снижается уровень АТР и на 97% падает содержание креатинфосфата (КР). Kaasik и соавт. [4] в те же сроки обнаружили снижение содержания АТР и КР соответственно на 15 и 50%, а в исследованиях Тельпухова и соавт. [5] падение АТР на 45% зарегистрировано лишь на 10-ой мин ишемии. Отличаются и другие показате-

ли биоэнергетики мозга, в том числе интактных животных. Коор и соавт. [6] в мозгу крыс отношение KP/P_1 нашли равным $3,1 \pm 0,3$ (экстракты), в работе Lill и соавт. [7] оно оказалось равным $5,3 \pm 2,8$ (данные *in vivo*), а в опытах Jackson и соавт. [8] этот показатель достигал значений $5,09 \pm 1,0$.

Таким образом, как для ишемической, так и для интактной ткани мозга в литературе приводятся показатели биоэнергетики, отражающие скорее различия использовавшихся методов и объектов исследований.

В настоящей работе была поставлена задача на основе разработанного чувствительного датчика для прижизненной регистрации [^{31}P]ЯМР спектров мозга изучить динамику изменений уровней фосфатных метаболитов мозга крыс во время ишемии различной длительности.

Материалы и методы

Существенной характеристикой датчика ЯМР является его чувствительность, которая прямо связана с затратами времени на получение спектра с высоким отношением сигнал/шум. Чувствительность датчика ЯМР в свою очередь определяет возможность применения ЯМР спектроскопии в изучении быстротекущих биологических процессов. Приводимые в литературе спектры [^{31}P]ЯМР органов *in vitro* и *in vivo*, как правило, требуют времени накопления сигналов ЯМР 5—20 мин.

Параметр чувствительности датчика ЯМР определяется выбором таких технических характеристик поверхностной катушки, как ее конфигурация и геометрические размеры. Дополнительным требованием к катушке является обеспечение высокой пространственной избирательности, то есть возможности регистрации сигнала ЯМР главным образом от изучаемого органа с минимальным вкладом сигналов от окружающих тканей. Эти требования во многом противоречивы, и в каждом конкретном случае требуется оптимальный выбор соответствующих параметров. Отношение сигнал/шум, развиваемое на входе предусилителя ЯМР спектрометра, определяется соотношением [9]

$$\text{сигнал/шум} \sim K n M_0 (Q \omega V / 4 k T)^{1/2} \quad (1),$$

где K —коэффициент, определяемый геометрией приемной катушки; n —«коэффициент заполнения» объема катушки образцом; M_0 —ядерная намагниченность; Q —добротность катушки; ω —частота ларморовской прецессии; V —объем катушки; k —постоянная Больцмана; T —температура катушки.

Нами использована двухсекционная объемно-поверхностная катушка (рис. 1), которая позволяет существенно повысить чувствительность и избирательность ЯМР по сравнению с распространенной в ряде работ плоской поверхностной катушкой [10—12]. Очевидно, что геометрические особенности использованной катушки обеспечивают увеличение объема образца, захватываемого высокочастотным полем, и увеличивают параметр $n V^{1/2}$. Кроме того, магнитная компонента высокочастотного поля,

позбуждаемая двухсекционной катушкой, характеризуется в сравнении с плоскостной спиральной большей эффективной составляющей в поперечном направлении к вектору постоянного магнитного поля (в соотношении (1) это учтено значением коэффициента K). Рассматриваемая двухсекционная объемно-поверхностная катушка была применена в разработанной нами конструкции датчика для ЯМР-Фурье спектрометра АМ-400 «Bruker» (рабочая частота 162 МГц для ядер фосфора), оснащенного сверхпроводящим магнитом с широким отверстием (теплое отверстие 89 мм). Датчик представляет собой полый дюралевый цилиндр диамет-



Рис. 1. Конфигурация двухсекционной двухвитковой поверхностной катушки
Рис. 2. Тестовый образец для эксперимента по оценке избирательности катушки: 1—раствор NAD; 2—фильтровальная бумага, пропитанная раствором P_1 ; 3—двухсекционная поверхностная катушка

ром 70 мм, внутри которого расположены элементы электронной схемы, приспособление для фиксации лабораторного животного, контактные разъемы для подключения датчиков физиологического контроля (ЭКГ, ЭЭГ, дыхания, pO_2 и др.). Фиксация животного осуществляется в специальной кассете из оргстекла, которая снабжена стереотаксическим устройством, обеспечивающим стандартизацию положения головы крысы относительно приемной поверхностной катушки.

Катушка выполнена из медного посеребренного провода диаметром 0,9 мм и установлена в датчик таким образом, чтобы плоскости секций были ориентированы параллельно вектору постоянного магнитного поля. Уменьшения диэлектрических потерь достигали использованием экрана Фарадея [13], выполненного в виде набора тонких эмалированных проводов между головой крысы и катушкой.

Пространственную избирательность датчика проверяли в серии экспериментов, в которой изучаемый объект (голова крысы) моделировался следующим образом: был изготовлен тестовый образец из слоя фильтровальной бумаги, пропитанной раствором P_1 , который имитировал верхние слои ткани головы крысы (кожа, мышцы, кости черепа), а также кювета с раствором NAD, имитирующая ткань головного мозга. Варьируя в эксперименте длительность зондирующего импульса при фиксированной временной задержке на релаксацию, мы добились того, что сигнал P_1 в спектрах $[^{31}P]$ ЯМР стал минимален при высоком уровне сигнала NAD (рис. 2, 3).

Аналогичные эксперименты были проведены с растворами других фосфорсодержащих метаболитов, регистрируемых в реальных экспериментах (АТР, КР) с тем, чтобы выяснить влияние на пространственную

избирательность различий во временах релаксации T_1 этих соединений. Значения длительности зондирующего импульса, при котором вклад верхнего слоя минимален, во всех экспериментах различались несущественно.

Регистрацию фосфорсодержащих метаболитов мозга крыс в дальнейшем проводили с использованием определенных в модельных экспериментах длительности зондирующего импульса (0,00003с) и временной задержки на релаксацию (0,3с), обеспечивающих минимальный вклад окружающих тканей в $[^{31}\text{P}]\text{ЯМР}$ спектры мозга. Кроме того, чувствительность разработанного датчика характеризовалась достаточно высоким отношением сигнал/шум. Спектры $[^{31}\text{P}]\text{ЯМР}$ мозга крыс *in vivo* с отношением сигнал/шум равным 8 могли быть получены за 30—60 с (рис. 4), что является принципиально важным в изучении динамики энергетических процессов в мозгу крыс в норме и при патологии.

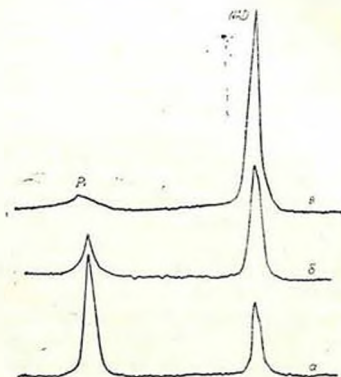


Рис. 3. Спектры $[^{31}\text{P}]\text{ЯМР}$, полученные в эксперименте по оценке избирательности поверхностной катушки: а—длительность зондирующего импульса 0,00001с; б—0,00002с; в—0,00003с. Задержка на релаксацию 0,3 с

Исследования динамики уровней макроэргических фосфатов мозга во время ишемии проведены на 27 белых беспородных крысах-самцах массой 150—255 г под тиопенталовым наркозом (80—90 мг/кг внутривенно). Животных содержали на обычном пищевом рационе вивария. За 12 ч до опыта их лишали пищи. Полную ишемию у крыс моделировали остановкой дыхания и кровообращения, что достигалось электрофибрилляцией мышцы сердца переменным электрическим током 27 В, который подавали на пару игольчатых электродов, закрепленных под кожей на грудной клетке в области сердца. Продолжительность действия электрического тока была равной 1—3 мин; в этот период у всех исследуемых животных развивалась полная остановка дыхания и сердечной деятельности. Последние контролировались по исчезновению электрической активности сердца (ЭКГ) и дыхательных движений с помощью электрокардиографа.

Перед фиксацией крыс в датчике ЯМР у наркотизированного животного скальпировали участок головы (1×2 см), к которому присоединяли катушку датчика с помощью встроенного стереотаксического устройства. Улучшения однородности магнитного поля B_0 добивались оптимизацией токов шимовых катушек при наблюдении сигнала протонов тканевой воды.

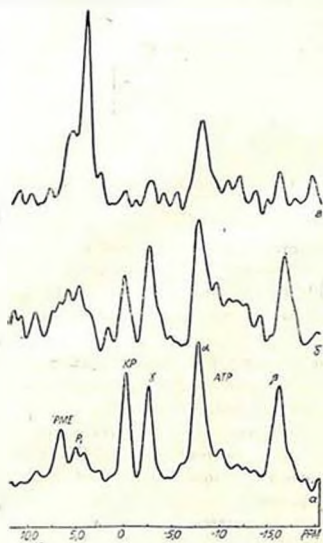


Рис. 4. Типичные $[^{31}\text{P}]$ ЯМР спектры мозга крысы *in vivo* (общее время накопления спектра 2 мин): а—контрольный спектр, б—на 2-й мин, в—на 8-й мин после остановки сердца. Одно деление шкалы химических сдвигов соответствует 1 м. д.

$[^{31}\text{P}]$ ЯМР спектры получали после Фурье-преобразования усредненных за 1,5—2 мин сигналов спада свободной индукции (когерентная сумма 150—300 сигналов для получения достаточно высокого отношения сигнал/шум). Регистрацию спектров вели на участке оперативной памяти ЭВМ объемом 1К, ширина спектра 7 КГц.

Поскольку задержка на релаксацию (0,3 с) короче времени релаксации T_1 любого из метаболитов, регистрируемых в $[^{31}\text{P}]$ ЯМР спектрах, соотношения интегральных интенсивностей спектральных линий не отражают, как правило, истинных концентраций, но изменения интегральных интенсивностей точно соответствуют содержанию метаболитов.

Исследование кинетики изменений энергетического метаболизма мозга при ишемии во всех экспериментах было однотипным: после снятия первых 3—4-х контрольных спектров на электроды, закрепленные на грудной клетке крыс, подавали ток и с началом остановки дыхания и сердечной деятельности каждую 1—2 мин регистрировали серию $[^{31}\text{P}]$ ЯМР спектров в процессе ишемии различной длительности.

Эксперимент полностью автоматизирован: сбор данных, запись их в долговременную память ЭВМ, обработку полученных спектров осуществляли на мини-ЭВМ спектрометра по специальной программе. Полученные серии спектров (25—30 спектров в серии) обрабатывали математически в ЭВМ с целью исключить из спектров широкий сигнал от фосфолипидов мозга (метод convolution difference [14]); затем определяли интегральные интенсивности линий в спектрах [^{31}P]ЯМР. Данные подвергали статистической обработке по критерию Стьюдента. Всего обработано свыше 700 спектров. Значение внутриклеточного pH_i вычисляли по формуле:

$$\text{pH}_i = 6,77 + \lg \frac{\delta P_i - 3,29}{5,68 - \delta P_i}$$

где δP_i —химический сдвиг сигнала P_i относительно сигнала КР [15].

Результаты и обсуждение

В интактном мозгу крыс среднестатистические показатели отношения интегральных интенсивностей сигналов $\text{КР}/P_i$ равны $2,17 \pm 0,03$; $\text{КР}/\beta\text{-АТР}$ $1,52 \pm 0,04$; $\text{АТР}/P_i$ $1,50 \pm 0,04$; внутриклеточное pH_i мозга составляет $7,14 \pm 0,01$. Эти результаты согласуются с данными Коор и соавт. и Petrofi и соавт. [6, 15].

На рис. 4 приведены типичные спектры [^{31}P]ЯМР мозга крысы в контроле, на 2- и 8-й мин после остановки сердца, демонстрирующие влияние ишемии на уровни фосфорных метаболитов. Уже в первые минуты ишемии наблюдается быстрое снижение уровней макроэргических фосфатов мозга, рост уровня P_i и фосфомоноэфиров (РМЕ) с одновременным развитием внутриклеточного ацидоза (рис. 5, 6). Другой закономерностью было наличие бифазного характера снижения интенсивностей сигналов КР и $\beta\text{-АТР}$, отличающегося наличием быстрой и медленной компонент снижения уровней.

В первой фазе (2—4 мин) интенсивность сигнала КР в спектрах [^{31}P]ЯМР снижалась на 50—40%, а сигналов P_i и РМЕ возрастала на 100—120%. В результате показатель $\text{КР}/P_i$ за это время стремительно падал до значений $0,41 \pm 0,05$ против $2,17 \pm 0,03$ в контроле. Внутриклеточное pH_i к 4-ой мин ишемии снижалось с $7,14 \pm 0,01$ в контроле до $6,77 \pm 0,05$ (рис. 6, б).

В подавляющем большинстве экспериментов (70%) снижение уровня АТР начиналось в первые минуты ишемии одновременно со снижением уровня КР. Через 4—6 мин интенсивность сигнала $\beta\text{-АТР}$ в спектрах [^{31}P]ЯМР у всех исследуемых животных снижалась на 35—40% от контрольной (рис. 5, б).

Вместе с тем, у части животных (30%) в первые минуты ишемии регистрировалось заметное повышение уровня АТР (в среднем на 15—20%), показанное на рис. 5, 6 пунктирной линией. Отношение $\beta\text{-АТР}/P_i$ в динамике ишемии (рис. 6, а), как и отношение $\text{КР}/P_i$ быстро снижалось и к 4-ой мин достигало среднего значения $0,30 \pm 0,04$ против $1,50 \pm 0,04$ в контроле.

Во второй, медленной фазе (6—30 мин) наблюдались менее значительные сдвиги в уровнях макроэргических фосфатов. Если интенсивность сигналов КР и β -АТР через 6—10 мин ишемии падала на 60%, то к концу исследуемого периода (на 30-ой мин)—на 70—80%. В это же время уровень P_i продолжал нарастать, достигая к 16—20-ой мин максимальных значений 380—400%. Отношения КР/ P_i и β -АТР/ P_i во второй фазе оставались минимальными (0,2—0,15, в 10 раз ниже исходных). После быстрого роста в первой фазе уровня РМЕ наблюдается, начиная с 4—6-ой мин, постепенное его снижение по мере удлинения

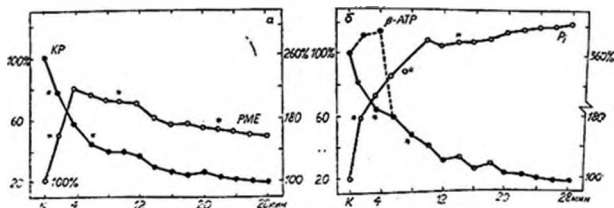


Рис. 5. Изменение интенсивности сигналов в $[31P]$ ЯМР спектрах мозга крыс *in vivo* (в % от контроля—К) в динамике 30 мин ишемии. Каждая точка равна среднестатистическому значению ($M \pm m$) 10—15 опытов; * $p < 0,01$ по сравнению с контролем

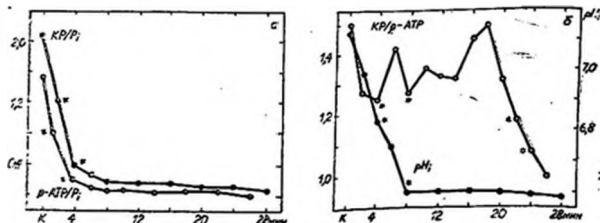


Рис. 6. Показатели биоэнергетики ($KР/P_i$, β -АТР/ P_i ; КР/ β -АТР) и внутриклеточного лацидоза (pH_i) ткани мозга крыс в динамике 30 мин ишемии. Статистические данные те же, что и на рис. 5.

ишемического периода. Изменение показателя КР/ β -АТР, отражающего взаимосвязь расходования этих макроэргов во время ишемии, имеет колебательный характер (рис. 6, 6). Падение этого отношения на 1—4-ой мин связано, по-видимому, с большей скоростью расходования КР по сравнению с АТР (креатинкиназная реакция); на 4—6-й мин рост этого показателя можно объяснить тем, что на этом этапе скорость распада АТР превышает скорость распада КР и т. д. К 8-ой мин кривая закисления выходит на плато и внутриклеточное pH_i достигает своего минимума $6,56 \pm 0,08$. К этому моменту отношение КР/ β -АТР возвра-

щается к значению, которое наблюдалось на 4-й мин ишемии. Дальнейшие колебания этого отношения пока трудно объяснить.

Обращает на себя внимание, что в наших экспериментах уровень КР падал медленнее, чем по данным Kaasik и соавт. [3], которые сообщали, что количество КР снижается до 0 спустя 1 мин ишемии. Наши результаты не подтверждают также данные Hillbегman и соавт. [18] об относительно устойчивом содержании АТР мозга пока соотношение KP/P_i не достигнет значения 0,5; при $KP/P_i = 0,5$ мы регистрировали уже довольно низкие уровни как КР, так и АТР.

Требует своего объяснения и наличие бифазного характера убывания сигналов КР и β -АТР. Petroff и соавт. [15] обнаружили бифазный характер исчезновения сигнала КР в спектрах $[^{31}P]$ ЯМР мозга кроликов; медленная компонента имела период полураспада около 1 ч, быстрая—порядка 1 мин. Авторами сделан вывод, что медленная компонента распада КР обусловлена вкладом в спектр $[^{31}P]$ ЯМР мозга сигналов от окружающих тканей (мышцы головы).

Мы проанализировали численными методами наши данные по убыванию сигналов КР и β -АТР путем аппроксимации экспериментальных точек теоретическими кривыми вида:

$$J = \sum_{i=1}^N J_i \exp\left(-\frac{t}{k_i}\right),$$

где N выбирали равным 1,2 или 3. Установлено, что экспериментальные точки убывания сигналов КР и β -АТР лучше всего ложатся (достигается минимум суммы квадратов отклонений) на теоретические кривые при $N=2$, что подтверждает, таким образом, бифазный характер расщедования макроэргов, причем быстрая компонента для КР имеет период полураспада около 1,3 мин, медленная—14,3 мин; для сигнала β -АТР соответственно 2,0 и 10,6 мин. Таким образом, медленная компонента убывания КР в нашем случае спадает в 4 раза быстрее, чем зарегистрировано в экспериментах Petroff и соавт. [15] и приписываемая ими мышечной ткани.

Чтобы окончательно убедиться в том, что мышечная ткань головы не влияет на регистрируемую в наших экспериментах медленную компоненту спада сигналов КР и β -АТР, мы определили периоды полураспада соответствующих сигналов в ткани скелетной мышцы крысы при ишемии. Протокол эксперимента аналогичен описанному выше, за исключением того, что поверхностную катушку накладывали на бедренную мышцу.

Анализ полученных результатов показал, что периоды полураспада КР мышцы составили около 0,3 мин (быстрый распад КР, вызванный контрактурой мышцы во время действия тока) и 40 мин; период полураспада АТР мышцы составил около 120 мин.

Таким образом, наличие бифазного характера распада макроэргов в ткани мозга не может быть объяснено вкладом мышц. Вероятно, бифазный характер обусловлен тем, что клетки головного мозга по-раз-

ному переживают состояние ишемии, и можно выделить по крайней мере два типа клеток, предположительно, глимальные и нейроны, для которых скорости расходования макроэргов сильно различаются. Это предположение вполне разумно, если учесть разную метаболическую активность этих клеток и данные об особой уязвимости нейронов в условиях гипоксии и ишемии [16].

С другой стороны, бифазный характер может быть обусловлен прогрессирующими с углублением тяжести ишемии повреждениями мембранных структур и ферментных систем. В пользу этого механизма свидетельствует зарегистрированное нами увеличение во время ишемии сигнала РМЕ (рис. 5, а), что связано с ростом внутриклеточного содержания фосфоэтаноламина, одного из структурных фрагментов мембранных липидов мозга [6]. В результате быстроразвивающихся структурных нарушений мембран клетки может происходить модификация ферментных систем и изменение их активности, следовательно, скоростей катализируемых ими реакций. Так, например, известно, что при ишемии вследствие структурной дезорганизации мембран происходит выход из нервной ткани в СМЖ фермента креатинкиназы [16, 17].

Таким образом, представленные данные позволили обнаружить ряд закономерностей динамики уровней макроэргических фосфатов мозга во время ишемии. Определены темпы снижения макроэргов, нарастания P_i и фосфомоноэфиров, а также развития внутриклеточного ацидоза. Установлен бифазный характер изменения внутриклеточного содержания креатинфосфата и АТФ в ишемической ткани мозга.

DYNAMICS OF CEREBRAL METABOLISM DURING ISCHEMIA BY ^{31}P -NMR SPECTROSCOPY DATA

LIKHODY S. St., *LIKHODY St. S., SIBELDINA L. A., SEMIONOVA N. A.

Institute of Chemical Physics USSR Acad. Sci., Moscow

*Medical Institute, Faculty of Biochemistry, Tselinograd

A probehead with a surface coil to record ^{31}P NMR spectra of rat brain in vivo is built.

The probehead is characterized by high sensitivity and space selectivity due to the advantageous configuration of surface coil. The developed construction permits to reduce essentially the time of rat brain spectrum acquisition up to 30–60 seconds and to investigate the dynamics of fast energetic processes in nervous tissue in vivo.

The dynamics of changes in the rat brain phosphorous metabolites during 30 minutes of complete ischemia was studied by means of ^{31}P -NMR in vivo. A rapid decrease in phosphocreatine and ATP reserves accompanied by an increase in P_i , phosphomonoesters levels and simultaneous development of intracellular acidosis were detected. The complete disappearance of phosphocreatine and ATP resonances was revealed to be biphasic. Possible mechanisms of established changes in the levels of macroergic compounds are discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Siesjo B. K.* J. Neurosurg., v. 60, p. 883—908, 1984.
2. *Луходий Ст. С.*—В кн.: Нарушения гомеостаза при экстремальных и терминальных состояниях (под ред. В. Г. Корпачева), с. 5—12, Новосибирск, 1981.
3. *Winn R. H., Rubio R., Bezne R. M.* Circulat. Res., v. 45, p. 486—492, 1979.
4. *Kaasik A. E., Nilsson L., Siesjo B. K.* Acta physiol. scand., v. 78, p. 433—447, 1970.
5. *Тельпухов В. И., Тренин С. О., Князев Г. Д., Лапкина Т. И.* Вестн. Акад. мед. наук СССР, № 4, с. 1—96, 1985.
6. *Kopp S. J., Krigstein J., Freidank A., Rachman A., Selbert A., Cohen M. M.* J. Neurochem., v. 43, p. 1716—1731, 1984.
7. *Litt L., Gonzalez-Mendez R., Severinghaus S. W., Hamilton W. K., Weinstein Ph. R.* Magn. Reson. in Medicine, v. 3, p. 619—625, 1986.
8. *Jackson D. J., Krywawych S., Tofts P., Wray S. J.* Physiol. (Gr. Brit.), v. 360, p. 80, 1985.
9. *Hoult D. T., Richards R. E. J.* Mag. Reson., v. 24, p. 71, 1976.
10. *Ackerman T. T. H., Grove T. H., Wong G. G., Gadian D. G., Radda G. K.* Nature, v. 283, p. 167, 1980.
11. *Behar K. L., den Hollander T. A., Petroff O. A. C., Hetherington H. P., Pritchard J. W., Shulman R. G.* J. Neurochem., v. 44, p. 1045—1055, 1985.
12. *Шкарик П. Ю., Самойленко А. А., Сибелькина Л. А.* Биофизика, т. 28, № 1, с. 122, 1983.
13. *Gadian D. G., Robinson F. N. H. J.* Mag. Reson., v. 34, p. 449, 1979.
14. *Campbell J. D., Dobson C. M., Williams R. J. P., Xavier A. J.* Magn. Reson., v. 54, p. 172, 1975.
15. *Petroff O. A. C., Pritchard J. W., Behar K. L., Alges J. R.* Neurology, v. 35, p. 781—788, 1985.
16. *Нисовский В. А., Гурвич А. М., Золотокрылина Е. С.*—В кн.: Посттравматическая болезнь, с. 183—195, М., Медицина, 1987.
17. *Bohmer T., Kjekshus J., Vaagenes P.* Scand. J. Clin. and Lab. Invest., v. 43, p. 261—265, 1983.
18. *Hillberman M., Subramanian V. H., Helweg-Gras J., Cone J. B., Egan S. W., Gyulal L., Chance B. J.* Cerebr. Blood Flow and Metab., № 4, p. 334—342, 1984.

Поступила 15. III 1988