

11. Putnam, B. E., Prohofsky E. W., Van-Zandt L. L. *Biopolymers*, 21, 885—894, 1982.
12. Zhurkin V. B., Lysov Yu. P., Ivanov V. J. *Biopolymers*, 17, 377—412, 1978.
13. Zhurkin V. B., Lysov Yu. P., Ivanov V. J. *Nucl. Acids. Res.*, 6, 1081—1096, 1979

Поступило 28.VIII 1986 г.

Биолог. ж. Армении, т. 40, № 3, 187—193, 1987 УДК 541.183:541.132:547.953:537.363

## АДСОРБЦИЯ ИОНОВ НА ПОВЕРХНОСТИ ЛИПОСОМ ИЗ ФОСФАТИДИЛХОЛИНА

С. А. ТАТУЛЯН

Институт цитологии АИ СССР, Ленинград

**Аннотация** — Методом микроэлектрофореза исследована адсорбция катионов щелочноземельных металлов и некоторых анионов на поверхности мультиламеллярных липосом из яичного фосфатидилхолина и адсорбция ионов кальция на липосомах из димиритоил- и дипальмитоилфосфатидилхолина. Результаты описаны в рамках теории Гуи-Штерна. Определены константы связывания ионов с поверхностью липосом и числа мест связывания на единицу площади.

**Անոտացիա** — Իրկրոլիեկտրաֆորեզի մեթոդով ուսումնասիրված է ալկալիաճողալիե մետաղների կատիոնների և որոշ ածխածնի ազատրոջիան միջ ֆոսֆատիդիլխոլինի մուլտիլամելլար լիպոսոմների մակերեսի վրա և կալցիումի իոնների ազատրոջիան դիմիրիտոիլ- և դիպալմիտոիլֆոսֆատիդիլխոլինի լիպոսոմների վրա: Արդյունքները նկարագրված են Գուի-Շտերնի տեսության շրջանակներում: Որոշված են լիպոսոմների մակերեսի հետ իոնների միացման և միավոր մակերեսի վրա միացման տեղերի թվի հաստատունները:

**Abstract** — Binding of alkaline-earth metal cations and some anions to egg phosphatidylcholine liposomes, as well as binding of calcium ions to dimyristoylphosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes is studied by microelectrophoresis. Binding constants and surface densities of binding sites are determined for several cations and anions with the help of Gouy—Stern theory.

**Ключевые слова:** липосома адсорбция ионов, поверхностный потенциал

В последнее время интенсивно исследуется адсорбция неорганических ионов на бислойных липидных мембранах, являющихся моделями клеточных мембран и представляющих в этом отношении значительный интерес. При этом имеет место существенное расхождение в параметрах адсорбции ионов, определенных разными авторами. Так, кажущаяся константа связывания ( $K_s$ ) ионов  $Ca^{2+}$  с фосфатными группами фосфатидилхолина (ФХ), определенная с помощью монослойной техники, составила  $6,4 \cdot 10^5 M^{-1}$  [18] и  $3,4 \cdot 10^6 M^{-1}$  [12]. Величина  $K_s$ , характеризующая связывание  $Ca^{2+}$  с моно- и бислоями из яичного ФХ, составила  $28,6 M^{-1}$  [16] и  $10—30 M^{-1}$  [10]. В то же время имеются сообщения о том, что ионы  $Ca^{2+}$  не связываются с монослоями из ФХ [9].

Установленные разными методами величины  $K_{Ca^{2+}}$  для мембран

из дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) составляют от 19 до  $3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  [4, 21].

Данных по адсорбции анионов на липидных мембранах в современной литературе крайне мало. Настоящая работа была предпринята с целью установления констант связывания и поверхностной плотности мест связывания ряда катионов и анионов с липосомами из разных ФХ.

Использовали яичный ФХ, выделенный хроматографически из яичного лецитина, выпускаемого Харьковским заводом по производству бактериальных препаратов. Димиристиоилфосфатидилхолин (ДМФХ) и ДПФХ синтезированы А. Е. Соколовой (Институт цитологии АН СССР). Анализ использованных ФХ методом ТСХ показал, что содержание фосфатидилхолина в препаратах составляет больше 99%. Результаты ГЖХ показали, что ДМФХ содержит 99,3% остатков миристиновой кислоты и 0,7% остатков пальмитиновой кислоты, а ДПФХ—99,9% остатков пальмитиновой кислоты и 0,1% остатков неидентифицированных жирных кислот. Использовали NaCl и CaCl<sub>2</sub> марки о. ч., MgCl<sub>2</sub> и BaCl<sub>2</sub> марки х. ч., SrCl<sub>2</sub>, BaBr<sub>2</sub> и Ba(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> марки ч. д. а. (Реахим, СССР), Ba(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> марки ч. д. а. (Schering A. G., ФРГ), триэтоксиметил)аминометан марки ч. д. а. (Serva, ФРГ). Во всех экспериментах была использована деионизованная вода (Super Q). Способ приготовления мультиламеллярных липосом описан ранее [19]. Электрофоретическую подвижность липосом измеряли на приборе Parmoquant-2 (Carl Zeiss Jena, ГДР). В каждом опыте измеряли среднее значение подвижности не менее 100 липосом. Стандартное отклонение составляло 5–20% от средних значений. Величины  $\zeta$ -потенциалов рассчитывали по уравнению Гельмгольца-Смолуховского:

$$\zeta = \eta \epsilon_0 \epsilon,$$

где  $\eta$ —электрофоретическая подвижность,  $\epsilon$  и  $\eta$ —соответственно диэлектрическая постоянная и вязкость водных растворов,  $\epsilon_0$ —диэлектрическая проницаемость вакуума.

Для описания связывания ионов с мембранами липосом использовали изотерму адсорбции Ленгмюра-Штерна [13]:

$$n = \frac{NK_1 C_0}{1 + K_1 C_0}, \quad (1)$$

где  $n$ —количество связанных ионов на единицу площади,  $N$ —число ионсвязывающих мест на единицу площади,  $K_1$ —истинная константа связывания,  $C_0$ —концентрация иона на границе раздела мембрана—водный раствор. Вклад в поверхностный заряд мембраны, обусловленный адсорбцией иона  $i$ , будет:

$$q_{\text{адс},i} = \frac{NeziK_{1i}C_{0i}}{1 + K_{1i}C_{0i}}, \quad (2)$$

где  $e$ —элементарный заряд,  $z_i$ —валентность  $i$ -го иона с учетом знака. Ионы распределяются в электростатическом поле по закону Больцмана:

$$C_{0i} = C_i e^{-z_i \Psi_0/kT}, \quad (3)$$

где  $C_i$ —концентрация  $i$ -го иона в объеме раствора,  $\Psi_0 = e\Phi_0/kT$ ,  $\Phi_0$ —потенциал внешней плоскости Гельмгольца,  $k$ —константа Больцмана,  $T$ —абсолютная температура. Если учитывать одновременно адсорбцию катиона и аниона, то для плотности заряда, скомпенсированной адсорбцией ионов, можно написать:

$$q_{\text{адс}} = \frac{N_k e z_k K_{1k} C_k e^{-z_k \Psi_0}}{1 + K_{1k} C_k e^{-z_k \Psi_0}} - \frac{N_a e z_a K_{1a} C_a e^{z_a \Psi_0}}{1 + K_{1a} C_a e^{z_a \Psi_0}}, \quad (4)$$

где индексы  $k$  и  $a$  относятся соответственно к катиону и аниону; валентности ионов берутся по абсолютной величине. Если мембрана заряжена независимо от адсорбции

полю и плотность собственного заряда составляет  $\sigma_0$ , то суммарная плотность заряда,  $\sigma$ , будет составлять:

$$\sigma = \sigma_0 + \sigma_{\text{агс}}. \quad (5)$$

С другой стороны, согласно теории двойного электрического слоя [9, 17]

$$\sigma = \text{sign } \kappa \{ 2 \varepsilon_0 \varepsilon_i N_A kT \sum C_i (e^{-z_i \kappa} - 1) \}^{1/2}, \quad (6)$$

где  $N_A$ —число Авогадро; суммирование производится по всем присутствующим в среде ионам. Комбинация уравнений 4–6 дает:

$$\sigma_0 + \frac{N_k e z_k K_{1k} C_k e^{-z_k \kappa}}{1 + K_{1k} C_k e^{-z_k \kappa}} - \frac{N_a e z_a K_{1a} C_a e^{z_a \kappa}}{1 + K_{1a} C_a e^{z_a \kappa}} - \text{sign } \kappa \{ 2 \varepsilon_0 \varepsilon_i N_A kT \sum C_i (e^{-z_i \kappa} - 1) \}^{1/2} = 0. \quad (7)$$

Уравнение 7 было использовано для описания зависимости поверхностного потенциала липосом от концентрации электролита и определения параметров адсорбции ионов. При этом предполагалось, что  $\zeta = \psi_0$ .

На рис. 1 представлены кривые зависимости  $\zeta$ -потенциала липосом из яичного ФХ от концентраций ряда электролитов. При построении теоретических кривых по уравнению 7 учитывали адсорбцию двухвалентного катиона на местах  $N_k$  и соответствующего аниона на местах  $N_a$ .

В случае с липосомами из «индивидуальных» липидов, ДМФХ и ДПФХ, наблюдается резкое смещение электрофоретической подвижно-

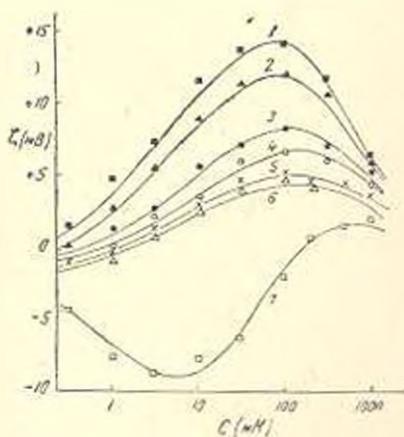


Рис. 1. Зависимость  $\zeta$ -потенциала липосом из яичного ФХ от концентраций  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{SrCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{BaBr}_2$ ,  $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$  и  $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$  (кривые соответственно 1–7) в присутствии 5 мМ трис- $\text{HCl}$  (рН 7.4) при 25°. Кривые 1–2 построены с использованием  $\sigma_0 = -0,2$  мКл/м<sup>2</sup>, кривая 5— $\sigma_0 = -28$  мКл/м<sup>2</sup> и кривые 6 и 7— $\sigma_0 = -0,36$  мКл/м<sup>2</sup>.

сти при температуре фазового перехода липида, что соответствует уменьшению положительного (или увеличению отрицательного) поверхностного потенциала липосом при переходе липида из состояния «гель» в состояние «жидкий кристалл» (эти данные не представлены). Рис. 2 и 3 демонстрируют зависимость  $\zeta$ -потенциала липосом соответственно из ДМФХ и ДПФХ от концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  при температурах ниже (кр. 1) и выше (кр. 2) температуры фазового перехода ( $T_c$ ) этих ли-

пидов. Поскольку  $T_{II}$  смещается в зависимости от содержания  $Ca^{2+}$  в среде, при каждой концентрации  $Ca^{2+}$  выбраны температуры, наблюдаемые непосредственно «перед» фазовым переходом и «после» него. Кривые зависимости поверхностного потенциала от концентрации адсорбирующегося иона  $j$ , обнаруживающие экстремум(ы) в значениях поверхностного потенциала (рис. 1, 2, 3), позволяют определить пара-

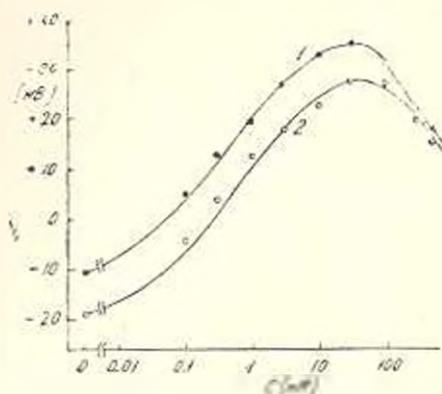


Рис. 2.

Рис. 2. Зависимость  $\zeta$ -потенциала липосом из ДМФХ от концентрации  $CaCl_2$  при температурах ниже ( $22-25^\circ$ , кр. 1) и выше  $T_{II}$  ( $25-28^\circ$ , кр. 2). Растворы содержали 2 мМ трие-НСl, pH 7,2. При построении теоретических кривых использованы значения  $\sigma_0 = -1,08$  (кр. 1) и  $-1,5$  мКл/м<sup>2</sup> (кр. 2).

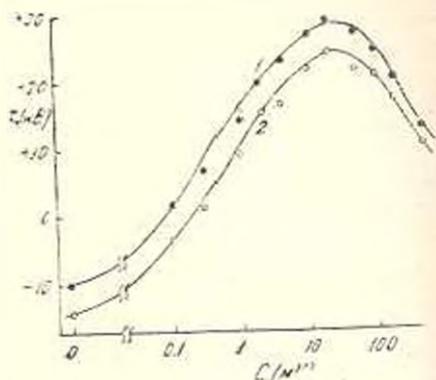


Рис. 3.

Рис. 3. Зависимость  $\zeta$ -потенциала липосом из ДМФХ от концентрации  $CaCl_2$  при температурах ниже ( $10-43^\circ$ , кр. 1) и выше  $T_{II}$  ( $43-46,5^\circ$ , кр. 2). Растворы содержали 2 мМ трие-НСl, pH 7,2. При построении теоретических кривых использованы значения  $\sigma_0 = -1,05$  (кр. 1) и  $-1,89$  мКл/м<sup>2</sup>.

метры  $K_j$  и  $N_j$  на основании экспериментальных значений  $\zeta_{\max}$  и  $C_{j, \max}$  ( $\zeta_{\max}$  — максимальное по абсолютной величине значение  $\zeta$ -потенциала,  $C_{j, \max}$  — концентрация потенциалопределяющего иона, соответствующая  $\zeta_{\max}$ ):

$$K_j = \frac{e^{z_j X}}{C_{j, \max}} \quad (8)$$

$$N_j = \frac{2}{z_j e} \left\{ \operatorname{sgn} X \left[ 2z_0 \sigma_0 N_j kT (C_{j, \max} (e^{-z_j X} - 1) + \sum_j C_{j, \max} (e^{-z_j X} - 1)) \right]^{1/2} - \sigma_0 \right\} \quad (9)$$

где  $X = z_0 \sigma_0 e / kT$ . После определения значений  $K_j$  и  $N_j$  для соответствующих ионов по уравнениям 8 и 9 на основании экспериментальных значений  $\zeta_{j, \max}$ ,  $C_{j, \max}$  и  $\sigma_0$  были построены теоретические кривые рис. 1, 2, 3 по уравнению 7. Найденные таким образом параметры адсорбции ионов представлены в табл. 1. Особенности кривой 7 на рис. 1 дают возможность строго определить параметры  $K_j$  и  $N_j$  одновременно для аниона ( $Cl_4^-$ ) и катиона ( $Ba^{2+}$ ). При описании кривых 4, 5, 6 рис. 1 с использованием уже известных параметров  $K_j$  и  $N_j$  для  $Ba^{2+}$  найдены соответствующие параметры для ионов  $Cl^-$ ,  $Br^-$  и  $NO_2^-$  на основании наилучшего совпадения расчетных кривых с эксперимен-

тальными. Адсорбция ионов  $\text{Cl}^-$  с теми же параметрами учитывается также при описании кривых 1–3, рис. 1. Теоретические кривые рис. 2, 3 построены по уравнению 7 без учета адсорбции анионов  $\text{Cl}^-$  ( $K_{\text{ад}} = 0$ ), хотя это не исключает возможности слабой адсорбции  $\text{Cl}^-$  на мембранах из ДМФХ и ДПФХ.

Селективное связывание неорганических анионов с мембранами из разных ФХ было продемонстрировано ранее некоторыми авторами. Грасдален и соавт. [10] определяли константу связывания ионов  $\text{Cl}^-$  с везикулами из яичного ФХ:  $K_1 = 0,065 \text{ M}^{-1}$ . Позже были получены следующие константы, характеризующие взаимодействие анионов с мембранами из яичного ФХ:  $K_1 = 0,9; 2,0$  и  $8,0 \text{ M}^{-1}$  соответственно для  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  и  $\text{NO}_3^-$  [22].  $K_{\text{ад}} = 0,15 \text{ M}^{-1}$  [6],  $K_{\text{ад}} = 1,67; 4,03$  и  $23,65 \text{ M}^{-1}$  соответственно для  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  и  $\text{SCN}^-$  [1]. В случае с мембранами из ДМФХ величины  $K_1$  для анионов  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$  и тринитрофенола составили соответственно 2, 3, 6, 10, 40, 222 и  $5000 \text{ M}^{-1}$  [19].

Величины констант связывания анионов  $\text{Cl}^-$  и  $\text{Br}^-$  с мембранами из яичного ФХ, определенные нами, хорошо согласуются с данными Эрикссона и соавт. [6, 22], однако константа связывания  $\text{NO}_3^-$ , установленная нами ( $2,8 \text{ M}^{-1}$ ), ниже найденной этими авторами ( $8 \text{ M}^{-1}$ ) [22]. Кажущиеся константы связывания ионов  $\text{Cl}^-$  и  $\text{NO}_3^-$  с везикулами из яичного ФХ, представленные в работе Барсукова и соавт. [1], превышают истинные константы связывания этих ионов, определенные в настоящей работе. Эти различия по-видимому, связаны с тем, что авторы упомянутых работ [1, 22] использовали «озвученные» везикулы, в то время как мы работали с мультисамельлярными липосомами.

Значения констант связывания,  $K_1$  ( $\text{M}^{-1}$ ), и площади на погосвязывающее место,  $N^{-1}$  ( $\text{нм}^2$ ), характеризующие связывание ионов с липосомами из яичного ФХ, ДМФХ и ДПФХ

Липид	Ион	$K_1$ ( $\text{M}^{-1}$ )	$N^{-1}$ ( $\text{нм}^2$ )	$t$ ( $^{\circ}\text{C}$ )
Яичный ФХ	$\text{Ca}^{2+}$	$42 \pm 5$	$10,7 \pm 1,1$	25
	$\text{Mg}^{2+}$	$30 \pm 4$	$10,7 \pm 1,2$	25
	$\text{Sr}^{2+}$	$16 \pm 2$	$12,5 \pm 1,2$	25
	$\text{Ba}^{2+}$	$10 \pm 1$	$12,8 \pm 1,5$	25
	$\text{Cl}^-$	$0,20 \pm 0,1$	$13,3 \pm 1,5$	25
	$\text{Br}^-$	$2,0 \pm 1$	$13,3 \pm 1,3$	25
	$\text{NO}_3^-$	$2,8 \pm 1$	$13,3 \pm 1,3$	25
	$\text{ClO}_4^-$	$70 \pm 10$	$16,2 \pm 1,2$	25
ДМФХ	$\text{Ca}^{2+}$	$392 \pm 30$	$8,7 \pm 1$	22
	$\text{Ca}^{2+}$	$256 \pm 25$	$10,3 \pm 1$	27
ДПФХ	$\text{Ca}^{2+}$	$441 \pm 42$	$7,2 \pm 1$	41
	$\text{Ca}^{2+}$	$190 \pm 15$	$7,6 \pm 1$	45

Истинные константы связывания  $\text{Ca}^{2+}$  с мембранами из ДМФХ и ДПФХ в состоянии «гель» составили соответственно 46 и  $120 \text{ M}^{-1}$ . Со-



ответствующие значения, установленные в настоящей работе, составляют 392 и 441 М<sup>-1</sup>. Величины K<sub>1</sub>, описывающие связывание щелочноземельных катионов с мембранами из яичного ФХ, равны 0,3—5,0 М<sup>-1</sup> [8, 25]. По данным настоящей работы, соответствующие значения K<sub>1</sub> составляют 10—40 М<sup>-1</sup>. Таким образом, найденные нами величины истинных констант связывания двухвалентных катионов с мембранами из ФХ примерно на порядок выше значений, установленных другими авторами. Для объяснения этого расхождения заметим, что авторы работ [9] определяли константы связывания по уравнению:

$$K_1 = \frac{f}{C_0(1 - mf)^m},$$

где f—часть молекул липида, участвующих в образовании комплексов с ионом, m—число молекул липида, связывающих один ион. Низкие значения констант связывания катионов с мембранами из яичного ФХ (K<sub>1, Ca<sup>2+</sup></sub> = 1 М<sup>-1</sup> [15] и 2,2 М<sup>-1</sup> [8]) были получены исходя из предположения, что комплексообразование происходит по стехиометрии липид:ион = 1:1, т. е. m = 1. Между тем для строгого определения K<sub>1</sub> необходимо иметь экспериментальное значение m. Как свидетельствуют наши данные (рис. 1, табл.), максимальное число ионсвязывающих мест на мембранах из яичного ФХ в среднем составляет 0,0828 нм<sup>-2</sup>. Если учитывать, что площадь на молекулу яичного ФХ в бислойных мембранах составляет примерно 0,7 нм<sup>2</sup> [8, 22], то получим, что при насыщении адсорбции на один связанный ион приходится m ≈ 17 молекул липида. Подставляя экспериментально найденное значение m = 17 в уравнение 10, получим существенно большие величины K<sub>1</sub> по сравнению с полученными авторами работ [8, 15] исходя из априорного значения m = 1. Аналогичным образом можно интерпретировать «высокие» значения констант связывания Ca<sup>2+</sup> с мембранами из ДМФХ и ДПФХ, поскольку в случае с этими липидами при насыщении адсорбции на один связанный ион Ca<sup>2+</sup> приходится 13—15 молекул липида.

Каким же образом можно объяснить этот нетривиальный результат?

Некоторыми авторами продемонстрировано наличие доменов плотной упаковки в бислойных мембранах из фосфолипидов и, соответственно, участков неупорядоченной организации молекул липида или структурных дефектов на границах между доменами [2, 14]. Заметим также, что как длинные оси углеводородных цепочек, так и ориентированные параллельно ламеллярной плоскости полярные группы молекул ФХ, расположены по двумерной гексагональной решетке [5, 20]. Структурные дефекты в бислоях из ФХ можно рассматривать как вакантные узлы решетки. Ясно, что каждый вакантный узел будет окружен шестью полярными группами окружающих молекул ФХ. В зависимости от соотношения полярных групп, обращенных к вакантному узлу положительным или отрицательным полюсом, в точке вакансии будет создан положительный, нулевой или отрицательный локальный электростатический потенциал, и вакантный узел может обладать сродством к аниону или катиону (см. [4]). Именно такие «вакансии» рассматриваются нами в качестве ионсвязывающих мест на мембранах из ФХ.

Согласно этой модели, количество катионсвязывающих и анионсвязывающих мест должно быть одинаковым. Данные таблицы свидетельствуют, что в случае с липосомами из яичного ФХ величина  $N^{-1}$  для четырех исследованных катионов составляет  $11,5 \pm 0,8 \text{ нм}^2$ , для четырех анионов  $12 \pm 1,3 \text{ нм}^2$ . Этот результат может служить подтверждением предлагаемой модели адсорбции ионов на поверхности мембран из цинтеринного липида.

Считаю своим приятным долгом поблагодарить А. Е. Соколову за синтез и любезное предоставление ДМФХ и ДПФХ, а также В. Б. Аракеляна, Н. С. Матинян и Г. Б. Мелкяна за обсуждение работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Барсуков Л. И., Волкова В. И., Шапиро Ю. Е., Викторов А. В., Быстров В. Ф., Берельсон Л. Д. Биорг. химия, 3, 1355—1361, 1977.
2. Некоп В. Г., Казаков В. А., Корнев А. И. Биофизика, 29, 410—411, 1981.
3. Татулин С. А. Биол. мембраны, 2, 383—394, 1985.
4. Akutsu H., Seelig J. Biochemistry, 20, 7366—7373, 1981.
5. Durst D. L., Hui S. W., Strozewski C. M. J. Supramol. Str., 5, 1—14, 1976.
6. Eriksson L. E. G., Westman J. Biophys. Chem., 23, 253—264, 1981.
7. Grahame D. C. J. Chem. Phys., 21, 1051—1060, 1953.
8. Grasdalen H., Eriksson L. E. G., Westman J., Ehrenberg A. Biochim. Biophys. Acta, 469, 151—162, 1977.
9. Hauser H., Dawson R. M. C. Eur. J. Biochem., 1, 61—69, 1967.
10. Hauser H., Hinckley C. C., Krebs J., Levine B. A., Phillips M. C., Williams R. J. P. Biochim. Biophys. Acta, 468, 364—377, 1977.
11. Hauser H., Phillips M. C., Levine B. A., Williams R. J. P. Eur. J. Biochem., 58, 133—144, 1975.
12. Kimizuka H., Kohetsu K. Nature, 196, 995—996, 1962.
13. Langmuir I. J. Amer. Chem. Soc., 40, 1361—1403, 1918.
14. Lee G. A., Birdsall N. J. M., Metcalfe J. C., Tian P. A., Warren G. B. Biochemistry, 13, 3699—3705, 1974.
15. McLaughlin A., Grathwohl C., McLarghlin S. Biochim. Biophys. Acta, 513, 338—357, 1978.
16. Mislowski R. L., Wells M. A. Biochemistry, 12, 967—975, 1973.
17. Müller H. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1, 1—8, 1933.
18. Selmiya T., Ohki S. Biochem. Biophys. Acta, 298, 546—561, 1973.
19. Tatullan S. A. Biochim. Biophys. Acta, 732, 159—195, 1983.
20. Trauble H. Naturwissenschaften, 58, 277—284, 1971.
21. Trauble H., Sackmann E. J. Amer. Chem. Soc., 94, 4499—4510, 1972.
22. Vanderkool J., Martonosi A. Arch. Biochem. Biophys., 133, 153—163, 1969.
23. Westman J., Eriksson L. E. G. Biochim. Biophys. Acta, 557, 62—78, 1979.

Получено 3.1.1987 г.