



УДК 577.352.54+615.211

ВЛИЯНИЕ КЕТАМИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СИНАПТОСОМ МОЗГА КРЫС

МЕРЕЖИНСКАЯ Н. В., ОКУНЬ Н. М., РАКОВИЧ А. А., ЛЫСКОВА Т. Н.,
АКСЕНЦЕВ С. Л., ОРЛОВ С. Н., КОНЕВ С. В.

Институт фотобиологии АН БССР, Минск

Общий анестетик кетамин (1 мМ) тормозит индуцированное Ca^{2+} выделение АХ из синапсом мозга без их деполяризации, действуя подобно блоктору кальциевых каналов верапамилом. Подавляется также выделение медиатора, индуцированное вератрином, открывающим натриевые каналы. Судя по распределению проникающего катиона 3Н-тетрафенилфосфония, кетамин в той же концентрации предотвращает тетродотоксинчувствительную деполяризацию синапсом, вызванную верагрином, но не 50 мМ KCl. Сделан вывод о действии кетамина на натриевые и кальциевые каналы нервных окончаний. В дозах свыше 2 мМ анестетик полностью деполяризует синапсомы. На основании сравнительного анализа ингибирования кетаминном и убаином Na^+ , K^+ -АТРазы синапсом предполагается, что эффект высоких концентраций кетамина объясняется неспецифическим нарушением ионной проницаемости пресинаптической мембраны.

Согласно существующим представлениям, общая анестезия, то есть потеря сознания и болевой чувствительности, возникает вследствие подавления центральных синапсов [1, 2]. Блокада синаптической передачи может быть достигнута за счет прекращения распространения потенциала действия в нервном окончании, торможения выделения нейромедиатора или нарушения процессов обратного его захвата, а также инактивации постсинаптического рецептора.

Кетамин—один из наиболее распространенных в клинике общих анестетиков—вызывает так называемую диссоциативную анестезию (при этом одни участки мозга возбуждаются, а другие угнетаются), воздействуя на таламо-кортикальные проводящие пути, лимбические структуры и задние рога спинного мозга [3]. Однако молекулярный механизм действия этого анестетика остается невыясненным. Из известных нейрохимических эффектов можно назвать угнетение нейронального захвата серотонина инорадреналина, изменение содержания в крови биогенных аминов и некоторых гормонов [3].

В настоящей работе на основании измерения выделения АХ и мем-

бранного потенциала показано, что кетамин в концентрациях до 1 мМ блокирует потенциалзависимые натриевые и кальциевые каналы синапсомозга крыс, не изменяя потенциал покоя. При более высоких концентрациях анестетик вызывает стойкую деполаризацию нервных окончаний, по-видимому, вследствие нарушения селективной ионной проницаемости мембран синапсомом.

Материалы и методы

Синапсомы из мозга белых крыс (150—200 г) получали по Hajos [4]. Суспензию синапсомом в 0,8 М сахарозе медленно разбавляли (20-минутное уравнивание) равным объемом охлажденной на льду среды, содержащей (в мМ): NaCl—145; KCl—5; $MgCl_2$ —1,4; NaH_2PO_4 —2,0; глюкоза—10; трис-HEPES буфер—20; pH 7,4; (среда «А»).

Синапсомы осаждали центрифугированием при 20000g в течение 6 мин, и осадок ресуспендировали в той же среде или в дистиллированной воде для измерения активности Na^+ , K^+ -АТФазы.

Выделение 3H -меченых продуктов из синапсомом, нагруженных 3H -холином. проводили по модифицированному методу Blaustein [5]. Синапсомы (0,5—0,6 мг белка/мл) преникубировали в течение 5 мин при 37°, затем вводили 3H -холинхлорид до конечной концентрации 1 нМ и инкубацию продолжали еще 30 мин, в течение которых происходил захват меченого холина и синтез из него АХ [6]. Аликваты по 0,7 мл (с радиоактивностью 55 нКи) разливали по пробиркам, в которые добавляли по 0,1 мл среды «А» с 20 мМ Ca^{2+} или без него; по 0,1 мл 10 мМ раствора кетамина в этой же среде и после 5-минутной инкубации в суспензию вводили по 0,1 мл вератрина (1 мг/мл) или KCl (500 мМ). Еще через 5 мин образцы быстро фильтровали под вакуумом через фильтры GF/F («Whatman», Англия) и трижды промывали 7 мл холодной инкубационной среды.

Величину выделения 3H -меченых продуктов из синапсомом определяли по снижению активности осадков на фильтрах в присутствии вератрина или KCl. В настоящей работе химическую природу этих продуктов не идентифицировали. Известно, однако, что в сходных экспериментальных условиях около 60% захваченного холина превращается в АХ [7], а 85% радиоактивности, освобождаемой при деполаризации, принадлежит меченому АХ и лишь 15%—неметаболизированному холину [8]. Учитывая это, индуцированное деполаризацией выделение 3H -продуктов из синапсомом интерпретировали как выделение АХ.

Для измерения мембранного потенциала синапсомом применяли меченый проникающий липофильный катион [3H] тетрафенилфосфоний ([3H]ТФФ $^+$). 0,85 мл суспензии синапсомом (0,5—0,6 мг белка/мл) преникубировали в течение 5 мин при 37°, затем вводили 0,95 мл раствора [3H]ТФФ $^+$ в среде до конечной концентрации 0,4 нМ (50 нКи). Равновесное распределение катиона достигалось менее чем за 3 мин. Все тестируемые соединения добавляли через 5 мин выдерживания с [3H]ТФФ $^+$, и после дополнительных 5 мин инкубации количество [3H]ТФФ $^+$ в синапсомом определяли по радиоактивности осадка на фильтрах GF/F после вакуумной фильтрации.

Использованный нами подход для расчета потенциала, в отличие от предлагавшегося ранее [9], позволяет корректно оценить его величину на внешней мембране синапсомом с учетом вкладов со стороны митохондрий и синаптических пузырьков.

Внутреннее содержимое синапсомом состоит из трех основных компартментов: цитоплазмы (с объемом $V_1=87,5$ —93,5%), митохондрий ($V_2=5$ —11,5%) и внутрисинапсомомных пузырьков ($V_3=1,5\%$) [10]. Трансмембранные потенциалы на плазматической, митохондриальной и пузырьковой мембранах обозначим, соответственно, E_1 , E_2 и E_3 . При добавлении к синапсомомам проникающего катиона, например

[³H]ТФФ +, он распределяется между компартментами в соответствии с их транс-мембранными потенциалами [11]:

$$C_{в}/C_{н} = \exp \left(- \frac{EF}{RT} \right),$$

где $C_{в}$ и $C_{н}$ — концентрация катиона внутри и снаружи компартмента соответственно; E — потенциал на мембране, ограничивающей данный компартмент; F — число Фарадея; R — универсальная газовая постоянная и T — температура по абсолютной шкале.

Содержание [³H]ТФФ + в каждом из компартментов в состоянии равновесия равно:

$$m_1 = V_1 C_0 \exp(-E_1 F/RT) \quad (1)$$

$$m_2 = V_2 C_0 \exp[-(E_1 + E_2) F/RT] \quad (2)$$

$$m_3 = V_3 C_0 \exp[-(E_1 + E_2) F/RT]. \quad (3)$$

где C_0 — концентрация [³H]ТФФ + во внешней среде; $m = V \cdot C$ — количество [³H]ТФФ +, находящегося в данном компартменте; индексы 1, 2 и 3 относятся, соответственно, к цитоплазме, митохондриям и внутрисинаптическим пузырькам. Следовательно, суммарное количество [³H]ТФФ + $= (M = m_1 + m_2 + m_3)$ (4)

В условиях деполяризации синапсом, например вератридином, открывающим натриевые каналы [12, 13], E_1 становится равным нулю и количество внутрисинаптического [³H]ТФФ + будет определяться уравнением:

$$M' = C_0 [V_1 + V_2 \exp(-E_2 F/RT) + V_3 \exp(E_3 F/RT)]. \quad (5)$$

Разделив уравнение (4) на (5), получим:

$$M/M' = \exp(E_1 F/RT), \quad (6)$$

или

$$E_1 = -RT/F \cdot \ln(M/M'). \quad (7)$$

Таким образом, для вычисления потенциала необходимо лишь найти отношение количеств внутрисинаптического [³H]ТФФ + без и в присутствии деполяризующих концентраций вератридина и не требуется определения объемов цитоплазматического, митохондриального и пузырькового матриксов.

Активность Na^+ и K^+ -АТФазы измеряли в синапсосомах (после их гипосмотического шока в воде) по освобождению P_i [14]. Инкубационная среда в конечном объеме 2 мл содержала разрушенные синапсосомы (100 мкг белка/мл), $MgCl_2$ (3 мМ), трис-НСI буфер (30 мМ, pH 7,55), NaCl (100 мМ), KCl (20 мМ). После преникубации при 37° (10 мин) реакцию начинали добавлением 0,5 мл АТФ до конечной его концентрации 3 мМ. Через 20 мин реакцию останавливали смешиванием суспензии с 1 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Скорость гидролиза АТФ получали вычитанием из суммарной активности АТФазы активности в присутствии $2 \cdot 10^{-4}$ М убаина.

Для определения радиоактивности фильтры высушивали на воздухе при 70° и помещали в сцинтилляционную жидкость PPO+POPOP (6 г/л и 0,075 г/л соответственно) в толуоле. Радиоактивность определяли на сцинтилляционном счетчике «Mark III», используя 10-ю программу для счета гетерогенных систем.

Белок определяли по Lowry и соавт. [15], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Препараты. В работе использовали тетродотоксин («Sankyo Co», Япония); вератрин, действующим началом которого является вератридин («Sigma», США); [³H]холинхлорид (78 Ки/моль) и [³H]тетрафенилфосфония бромид (24 Ки/ммоль) («Amersham», Англия); кетамин гидрохлорид («Ketalar, Parke-Davis», Англия); АТФ- Na_2 («BDH», Англия); убаин («Sigma», США); бычий сывороточный альбумин («Sigma», США); соли отечественного производства, квалификации ос. ч.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены основные характеристики системы выделения АХ из синапсосом. Деполяризация синапсосом вератрином, открывающим натриевые каналы, или 50 мМ КСl, снижающим калиевый равновесный потенциал, вызывает выделение АХ, усиливающееся в присутствии 2 мМ Ca^{2+} . Этот эффект особенно выражен при калиевой деполяризации. Из данных таблицы следует, что инкубация в присутствии одного лишь кальция (без деполяризации вератрином или КСl) также приводит к частичному спонтанному выделению АХ. Подобное действие кальция наблюдалось ранее в отношении выделения эндогенного норадреналина из синапсосом [5]. Рациональное объяснение заключается, по-видимому, в том, что какая-то часть Ca^{2+} -каналов в синапсосомах остается открытой и пропускает кальций без деполяриза-

Таблица 1

Влияние кетамина на выделение ацетилхолина (АХ) из синапсосом мозга крыс, вызванное вератриновой и калиевой деполяризацией

Деполяризующее воздействие	Добавки		Радиоактивность образцов, имп/мин	
	Ca^{2+} (2 мМ)	Кетамин (1 мМ)	Содержание ^3H - меченых соединений в синапсосах	Выделение радио- активных соеди- нений
Вератрин** (100 мкг/мл)	—	—	2579±68	
	+	—	2101±33	478±76*
	+	+	2428±60	
	+	+	2218±34	210±69*
	—	—	1943±23	696±72
	—	+	2335±48	93±77
КСl** (50 мМ)	+	—	1369±30	732±45
	+	+	2119±16	99±38
	—	—	2111±30	468±74
	—	+	1949±54	479±81
	+	—	1239±21	872±39
	+	+	1800±38	418±51

Примечание. Представлены средние значения из 5 измерений. * Выделение АХ без деполяризации рассчитывали как разность между содержанием ^3H -меченых соединений в синапсосах без кальция и после его добавления. ** Выделение АХ в опытах с деполяризацией определяли по разности содержания ^3H -меченых соединений в синапсосах без и в присутствии деполяризующих агентов с соответствующими добавками.

ции, или существует фракция деполяризованных синапсосом с открытыми кальциевыми каналами. Действительно, как было показано нами ранее [16], Mg^{2+} , конкурирующий с Ca^{2+} , и блокатор кальциевых каналов верапамил, но не блокатор натриевых каналов тетродотоксин, уменьшают спонтанное выделение АХ, обусловленное только кальцием. На существование в синапсосах определенной доли открытых каналов указывают и прямые данные по входу $^{45}\text{Ca}^{2+}$ [5, 16].

Как видно из табл. 1, кетамин в концентрации 1 мМ примерно на 50% снижает выделение АХ, обусловленное Ca^{2+} без деполяризации. Тормозящее влияние кетамина оказывает и на Ca^{2+} -зависимое выделение АХ при деполяризации синаптосом вератрином или КСl. Подавление Ca^{2+} -зависимой секреции можно объяснить блокадой кетаминном кальциевых каналов и/или ингибированием Ca^{2+} -зависимого экзоцитоза синаптических пузырьков, содержащих медиатор. Здесь следует обратить внимание на тот факт, что кетамин снижает Ca^{2+} -зависимое выделение АХ в недеполяризующих условиях с той же эффективностью (~ 50%), что и верапамил [16]. Наблюдающееся сходство в эффективности блокады Ca^{2+} -зависимого выделения АХ верапамилом и кетаминном указывает на кальциевый канал как наиболее вероятную мишень для кетамина в системе Ca^{2+} -зависимого выброса АХ.

Выделение медиатора при деполяризации вератрином или КСl наблюдалось в наших опытах и без экзогенного Ca^{2+} (табл. 1). Возможными причинами этого Ca^{2+} -независимого выделения могут быть: а) наличие в популяции синаптосом замкнутых мембранных пузырьков, транспортирующих медиатор и имеющих мембранный потенциал, но лишенных аппарата Ca^{2+} -зависимого экзоцитоза [17]; б) существование в выделенных нервных окончаниях двух пулов АХ, причем высвобождение медиатора из одного пула (связанного, возможно пузырькового) зависит, а из второго (свободного, цитоплазматического) — не зависит от экзогенного Ca^{2+} [18]; в) несмотря на отсутствие Ca^{2+} в инкубационной среде, секреция АХ осуществляется по Ca^{2+} -зависимому пути, но за счет освобождения Ca^{2+} из внутрисинаптического депо при деполяризации [19]. В этой связи важно подчеркнуть, что Ca^{2+} -независимое выделение АХ, индуцированное деполяризацией вератрином, но не КСl, блокируется тетродотоксином [16]. Иными словами, процесс выделения медиатора при деполяризации вератрином целиком инициируется открытием натриевых каналов. Таким образом, по выделению АХ в условиях специфической (вератрин) и неспецифической (КСl) деполяризации можно оценивать состояние (открытое или закрытое) натриевых каналов в синаптической мембране. Из представленных в табл. 1 данных следует, что кетамин в концентрации 1 мМ существенно тормозит выделение медиатора, вызванное вератрином в бескальциевой среде, не затрагивая выделение, обусловленное калиевой деполяризацией. Такое избирательное ингибирование свидетельствует о влиянии кетамина на натриевые каналы синаптических мембран. Этот вывод был подтвержден при измерении потенциала на наружной мембране синаптосом. Контрольные значения мембранного потенциала, составлявшие в наших условиях 30—40 мВ (минус внутри), находятся в соответствии с данными других авторов, использовавших ^3H ТФФ + [20]. Как видно из рис. 1, кетамин в концентрации ниже 1—2 мМ не изменяет мембранный потенциал синаптосом и эффективно предотвращает деполяризующий эффект вератрина ($\text{C}_{0,5} = 0,5\text{—}1\text{ мМ}$). В противоположность вератриновой, калие-

вая деполяризация не чувствительна к кетамину, который в этом отношении оказался сходным с тетродотоксином, полностью устранявшим только вератринную деполяризацию [16]. Следовательно, имеется четкая корреляция между результатами, полученными по тесту выделения АХ и измерению мембранного потенциала. Такое соответствие между ответами на кетамин у натриевых каналов холинэргических синапсов (тестируемых по вератрининдуцированному выделению АХ), и всей популяции синапсов (анализируемых по вератрининдуцированному снижению потенциала) позволяет говорить о сходной чувствительности каналов к анестетику вне зависимости от типа (медиаторной «принадлежности») первого окончания.

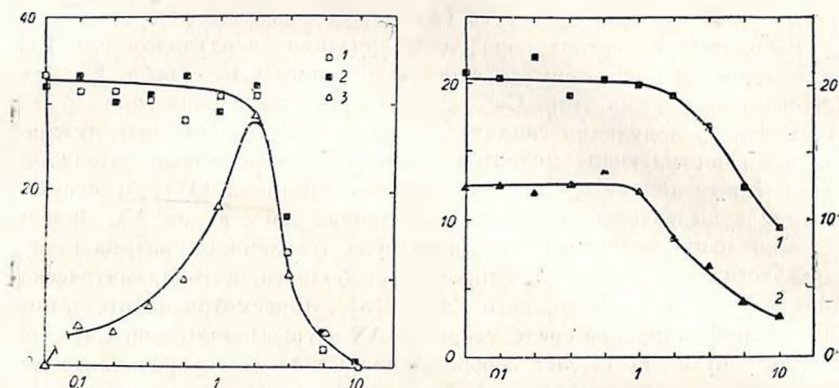


Рис. 1. Зависимость величины потенциала на плазматической мембране синапсом от концентрации кетамин. Условия инкубации (37°): 1 — 5 мин с $[^3\text{H}]\text{ТФФ} +$ ($0,4 \text{ нМ}$), затем 10 мин с кетамин; 2 — одновременно с $[^3\text{H}]\text{ТФФ} +$ вводился тетродотоксин ($1 \cdot 10^{-7} \text{ М}$); 3 — через 5 мин после добавления кетамин введен вератрин (100 мкг/мл) с последующей инкубацией в течение 5 мин. По оси абсцисс — концентрация кетамин, мМ ; по оси ординат — величина потенциала ($-\Delta E$, мВ)

Рис. 2. Влияние кетамин на активность Na^+ , K^+ -АТФазы осмотически разрушенных синапсом (1) и содержание $[^3\text{H}]\text{ТФФ} +$ в интактных синапсах, предварительно деполяризованных вератрином (2). По оси абсцисс — концентрация кетамин, мМ ; по оси ординат слева — активность АТФазы ($\text{мкмоль } \text{P}_i/\text{мг белка/ч}$); по оси ординат справа — содержание $[^3\text{H}]\text{ТФФ} +$ (в $\text{имп/мин} \cdot 10^{-3}$).

Концентрации кетамин выше 2 мМ вызывают резкую и полную деполяризацию синапсом. При интерпретации снижения мембранного потенциала следует рассмотреть несколько альтернативных механизмов: 1) специфическое и стойкое открытие натриевых каналов (по аналогии с действием вератрина); 2) ингибирование натриевого насоса (Na^+ , K^+ -АТФазы) мембран за счет прямого взаимодействия с ним или вследствие истощения запасов эндогенного АТФ из-за разобщения окислительного фосфорилирования во внутрисинапсомных митохондриях; 3) нарушение ионного баланса в синапсах в ре-

зультате повышения неспецифической проницаемости для ионов. Первое легко исключается тем фактом, что тетродотоксин не способен предотвращать деполяризующее влияние больших концентраций кетаминна (рис. 1). В пользу второго механизма свидетельствуют, на первый взгляд, два обстоятельства— а) кетамин действительно снижает содержание $[^3\text{H}]\text{ТФФ}^+$ в синапсосамах, наружные мембраны которых предварительно деполяризованы вератрином, что указывает на падение мембранного митохондриального потенциала и, как возможное следствие, разобщение окислительного фосфорилирования; б) при тех же концентрациях кетамин ингибирует Na^+ , K^+ -АТФазу синапсосом, подвергнутых осмотическому шоку (рис. 2). Однако, как следует из табл. 2, специфический ингибитор Na^+ , K^+ -АТФазы убаинн ($5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) снижает потенциал на плазматической мембране синапсосом лишь на 20%. В то же время кетамин (10 мМ) полностью деполяризует синаптическую мембрану, но активность Na^+ , K^+ -АТФазы при этом уменьшается не более чем на 50%. Отсюда следует, что мощное деполяризующее действие высоких концентраций кетаминна нельзя целиком объяснить лишь исключением натриевого насоса. Значительный вклад в этот эффект вносит, по-видимому, неспецифическое изменение проницаемости для Na^+ и K^+ за счет структурной модификации мембран.

Таблица 2

Влияние кетаминна и убаинна на потенциал покоя синапсосом и Na^+ , K^+ -АТФазу синаптических мембран

Добавки	E, мВ	Na^+ , K^+ -АТФаза, (мкмоль P_i /мг белка/ч)
—	$-35,2 \pm 1,5$	$20,5 \pm 0,4$
Кетамин (10 мМ)	0	$9,5 \pm 0,3$
Убаинн (0,5 мМ)	$-29,8 \pm 3,0$	0

Примечание. Время инкубации синапсосом с добавками—10 мин

Таким образом, кетамин в концентрациях до 1 мМ блокирует потенциалзависимые натриевые и кальциевые каналы синапсосом и не изменяет потенциал покоя. Важнейшим функциональным следствием подобных эффектов может быть торможение секреции нейромедиаторов, то есть блокада синаптической передачи. При более высоких, скорее всего токсических, концентрациях кетаминна потенциал покоя падает вследствие нарушения селективности ионной проницаемости мембраны.

EFFECT OF KETAMINE THE FUNCTIONAL-STATE OF RAT BRAIN SYNAPTOSOMES

MEREZHINSKAYA N. V., OKOON I. M., RAKOVICH A. A., LYSKOVA T. I.,
AKSENTSEV S. I., ORLOV S. N., KONEV S. V.

Institute of Photobiology, Acad. Sci. Belorussian SSR, Minsk

Ca^{2+} -induced release of acetylcholine from rat brain synaptosomes measured in the absence of depolarizing agents is depressed by general anesthetic ketamin (1 mM), this action being similar to that of Ca^{2+} -channel blocker verapamil. Ca^{2+} -independent transmitter release induced by veratrine-mediated opening of Na^{+} -channels was also inhibited. Judged by the distribution of ^3H / tetraphenyl-phosponium ketamine prevents the tetrodotoxin-sensitive depolarization evoked by veratrine but not by 50 mM KCl. Conclusion was made about ketamine influence on Na^{+} - and Ca^{2+} -channels of nerve endings. At doses above 2 mM the anesthetic caused complete depolarization of synaptosomes. Comparative analysis of synaptosomal $\text{Na}^{+}, \text{K}^{+}$ -ATPase inhibition by ketamine and ouabaine shows that ketamine at high doses perturbs the presynaptic membrane nonspecifically damaging its ion permeability.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Roth S. H. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., v. 19, p. 159—179, 1979.
2. Seeman P. Pharmacol. Rev., v. 24, № 4, p. 583—655, 1972.
3. Беляевский А. Д., Каркищенко Н. Н., Бурмудейяль Р. Ч. Анестезиология и реаниматология, т. 4, № 1, с. 67—71, 1982.
4. Hajos F. Brain Res., v. 93, № 3, p. 485—489, 1975.
5. Blaustein M. P. J. Physiol. (Gr. Brit.), v. 247, № 2, p. 617—655, 1975.
6. Marchbanks R. M., Wonnacot S., Rublo M. A. J. Neurochem., v. 36, № 2, p. 379—393, 1981.
7. Haga T., Noda H. Biochim. et biophys. acta, v. 291, № 2, p. 564—575, 1973.
8. Mulder A. H., Yamamura H. I., Kuhar M. J., Snyder S. H. Brain Res., v. 70, № 1, p. 372—376, 1974.
9. Lichtstein D., Kaback H. R., Blume A. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 76, № 2, p. 650—654, 1979.
10. Deutsch C., Drown C., Rafalowska U., Silver L. A. J. Neurochem., v. 36, № 6, p. 2063—2072, 1981.
11. Grinius L. L., Jasaitis A. A., Kadziauskas Y. P., Liberman E. A., Skulachev V. P., Topali V. P., Tsofina L. M., Vladimirova M. A. Biochim. et biophys. acta, v. 216, № 1, p. 1—12, 1970.
12. Ulbricht W. Ergeb. Physiol. Biol. Chem. Exp. Pharmacol., v. 61, № 1, p. 18—71, 1969.
13. Krueger B. K., Blaustein M. P. J. Gen. Physiol., v. 76, № 3, p. 287—313, 1980.
14. Fiske C. H., Subbarow J. J. Biol. Chem., v. 66, № 2, p. 375—380, 1925.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, № 1, p. 265—275, 1951.
16. Aksentsev S. L., Rakovitch A. A., Okoon I. M., Konev S. V., Orlov S. N., Kravtsov G. M. Pflügers Arch., v. 397, № 1, p. 135—140, 1983.
17. Kanner B. J. Biochemistry, v. 19, № 4, p. 692—697, 1980.
18. Haycock J. W., Levy W. B., Denner A. L., Cotman C. W. J. Neurochem., v. 30, № 5, p. 1113—1125, 1978.
19. Kelly B. R., Deutsch J. W., Carlson S. S., Wagner J. A. Ann. R. ev. Neurosci., v. 2, p. 399—446, 1979.
20. Ponzio G., Jacques Y., Frelin Ch., Chicheportiche R., Lazdunski M. FEBS Lett., v. 121, № 2, p. 265—268, 1980.

Поступила 20. IV. 1985-