

УДК 577.323.2:547.963.32

**МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСЫ ДНК И МЕТАЛЛИЗАЦИЯ МАКРОМОЛЕКУЛЫ  
В РАСТВОРЕ****Н.А. Касьяненко<sup>1</sup>, Z. Qiushi<sup>1</sup>, М.С. Варшавский<sup>1</sup>, В.М. Бакулев<sup>1</sup>, В.Н. Демидов<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Физический факультет, Россия

E-mail: nkasyanenko@mail.ru

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский технологический институт, Россия

Статья поступила 11 мая 2016 г.

В работе рассмотрены комплексы ДНК с ионами серебра и координационным соединением серебра, содержащим фенантролиновые лиганды. Проанализированы условия формирования люминесцирующих нанокластеров и наночастиц серебра, обладающих плазмонным резонансом. Показано, что нанокластры образуются при восстановлении ионов серебра после формирования их координационных связей с азотистыми основаниями макромолекулы. Соединение  $\text{Ag}(\text{Phen})_2\text{NO}_3$  преимущественно взаимодействует с ДНК путем интеркаляции одного из фенантролиновых лигандов в двойную спираль. Предварительное связывание *цис*-ДДП с ДНК препятствует формированию серебряных нанокластеров.

DOI: 10.15372/JSC20170227

**Ключевые слова:** ДНК, наночастицы и люминесцирующие нанокластеры серебра,  $\text{Ag}(\text{Phen})_2\text{NO}_3$ , *цис*-ДДП.

Создание металлокомплексов ДНК и металлизация макромолекулы в растворе привлекают внимание исследователей в связи с целым рядом проблем, для решения которых необходимо получить информацию о течении этих процессов, а также об изменении конформации макромолекулы в результате подобных реакций. В частности, в последнее время молекула ДНК является объектом манипуляций при создании различных наноструктур, в том числе и в качестве материала для создания нанопроволок, волноводов, сенсоров, датчиков и др. [ 1—3 ]. Для таких систем в некоторых случаях в зависимости от конкретных задач необходимо провести металлизацию ДНК в растворе или на подложке. Восстановление серебра для металлизации макромолекулы может привести к формированию структур с интересными оптическими свойствами [ 4—6 ]. Наиболее отработанной методикой является восстановление ионов металлов после их связывания с ДНК в растворе. При создании структур на подложке металлизация ДНК также чаще всего протекает в растворе при нанесении его капли на предварительно зафиксированные на выбранной поверхности молекулы ДНК [ 7 ]. В связи с этим изучение взаимодействия макромолекулы с ионами металлов и металлосодержащими соединениями в растворе является первым шагом для подбора условий металлизации ДНК согласно выбранной стратегии. В одних случаях необходимо равномерное покрытие макромолекул или их ассоциатов восстановленным металлом, в других надо добиться определенной периодичности в расположении металлических наночастиц на полимерной цепочке.

Как известно, ионы металлов в растворе гидратированы, как и фосфатные группы ДНК, отрицательно заряженные практически во всем диапазоне рН. Ионы одновалентных щелочных

металлов практически не имеют фиксированных мест связывания на ДНК. Они формируют облако подвижных ионов вблизи макромолекулы, электростатически притягивающихся к ее фосфатным группам, но из-за броуновского движения остающихся во власти растворителя. Энергия притяжения двухвалентных ионов к ДНК выше, поэтому они могут формировать достаточно устойчивые комплексы. В подавляющем большинстве случаев взаимодействие происходит через молекулу воды. Ионы щелочноземельных металлов взаимодействуют с фосфатными группами макромолекулы, а ионы переходных металлов могут формировать комплекс с ДНК, располагаясь в большой бороздке [8]. Принято считать, что ионы таких металлов, как медь, марганец, никель, образуют хелатный комплекс, связываясь с группами N7 и O6 гуанина. В растворе существует равновесие между связанными с ДНК и свободными двухвалентными ионами. Ионы трехвалентных металлов образуют более прочные комплексы с молекулой ДНК. Равновесие сдвинуто в сторону комплексообразования. Тепловое движение в растворе разрушить такие комплексы неспособно.

Исходя из сказанного выше, одновалентные ионы не образуют устойчивых комплексов с ДНК, поэтому для металлизации ДНК они не годятся. Однако среди них есть исключение. Это ионы серебра и ртути. В работе рассмотрено взаимодействие ДНК с ионами серебра и координационным соединением серебра с фенантролином. Проведено сравнение конформационных изменений ДНК в присутствии этих соединений, рассмотрена возможность металлизации макромолекулы в растворе.

#### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И МАТЕРИАЛЫ

Использовали высокомолекулярную ДНК тимуса телят (Sigma) с молекулярной массой  $11 \times 10^6$ , реактивы марки ХЧ, координационные соединения: серебро с фенантолином  $[\text{Ag}(\text{Phen})_2]\text{NO}_3$ , в работе упоминаемое как  $\text{Ag}(\text{Phen})$ , и *цис*-диамминдихлорплатина (*цис*-ДДП).

Спектры поглощения растворов получены на спектрофотометрах СФ-56 и СФ-2000 (Россия) в кварцевых кюветах 1 см.

В работе определяли относительную вязкость  $\eta_r$  растворов ДНК одной концентрации при разном содержании изучаемых соединений. По изменению приведенной вязкости раствора ДНК  $(\eta_r - 1)/C$ , где  $C$  — концентрация ДНК, следили за уменьшением или увеличением объема макромолекулы в растворе.

Для регистрации спектров кругового дихроизма (КД) ДНК использовали автодихрограф Mark IV (Франция).

Измерения проводили при температуре 21 °С.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе рассмотрим характер взаимодействия ионов серебра с молекулой ДНК, что служит основой для дальнейшей металлизации макромолекулы. Ранее это взаимодействие было рассмотрено в работах [9—11]. В нашем случае при использовании двуспиральной высокомолекулярной ДНК использовали разбавленные растворы, в которые добавляли рассчитанную концентрацию  $\text{AgNO}_3$ . Взаимодействие проявляется в изменении спектров поглощения и спектров кругового дихроизма ДНК (рис. 1), что указывает на участие азотистых оснований ДНК в комплексообразовании.

Спектры УФ поглощения ДНК (см. рис. 1, а) с увеличением концентрации  $\text{Ag}^+$  в растворе изменяются следующим образом. При концентрациях серебра до  $1,4 \times 10^{-5}$  М, что соответствует 0,19 ионов серебра, приходящихся на одну фосфатную группу (4 на пару оснований) ДНК, наблюдается гипохромный эффект с батохромным сдвигом полосы поглощения ДНК. Превышение этой концентрации приводит к появлению гиперхромного эффекта, что может свидетельствовать о дестабилизации системы водородных связей между комплементарными цепями. Спектры кругового дихроизма тех же растворов (см. рис. 1, б) также демонстрируют качественное различие в состоянии систем до и после этой концентрации. Остается предположить, что указанная концентрация ионов серебра отмечает насыщение таких мест связывания на ДНК, уча-

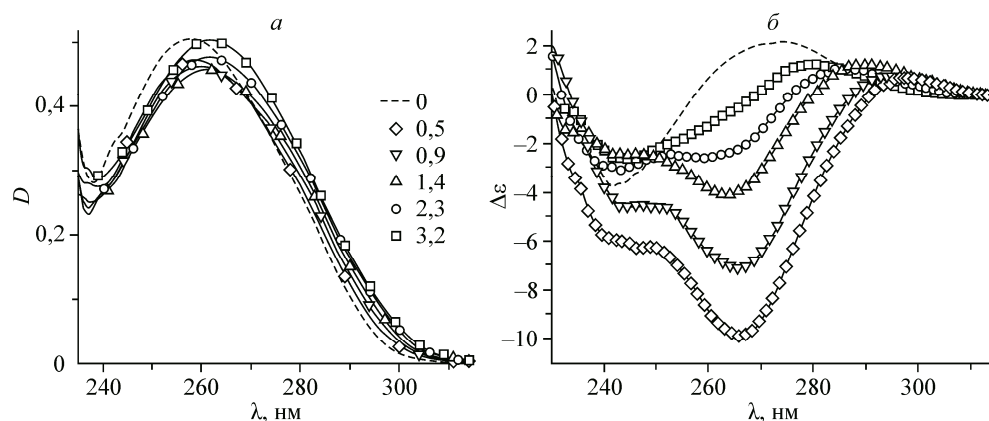


Рис. 1. Спектры поглощения (а) и кругового дихроизма (б) ДНК при разных концентрациях нитрата серебра, концентрация которого приведена на рисунках как  $C_{\text{AgNO}_3} \cdot 10^5$  М. Во всех системах  $C_{\text{ДНК}} = 0,0025$  %

стие которых в комплексообразовании сопровождается рассмотренными выше спектральными изменениями с сохранением стабильной вторичной структуры ДНК. Подобные изменения в спектре поглощения ДНК наблюдаются при использовании известного координационного соединения, связывающегося с ДНК по позиции N7 гуанина — *цис*-ДДП (рис. 2, а).

Вискозиметрические исследования показали (см. рис. 2, б), что для образования устойчивого комплекса ДНК с  $\text{Ag}^+$  необходимо время. В день приготовления растворов их приведенная вязкость совпадает со значением, полученным для исходного раствора без  $\text{AgNO}_3$  (для сохранения постоянства ионной силы добавляли рассчитанную концентрацию  $\text{NaNO}_3$ ). Через сутки вязкость падает на 40 %. Насыщение связывания наблюдается при  $C_{\text{AgNO}_3} > 3 \cdot 10^{-5}$  М (при используемой в этом эксперименте концентрации ДНК это соответствует тому, что около 2—3 ионов серебра приходится на 10 пар оснований). По-видимому, после заполнения такого типа вакантных мест для ионов серебра дальнейшее связывание приводит к дестабилизации вторичной структуры макромолекулы.

Полученный при изучении вязкости растворов результат может указывать на возможное образование координационной связи ионов серебра с N7 гуанина. Именно такая связь в случае препаратов платины формируется через время, измеряемое часами. Серебро способно форми-

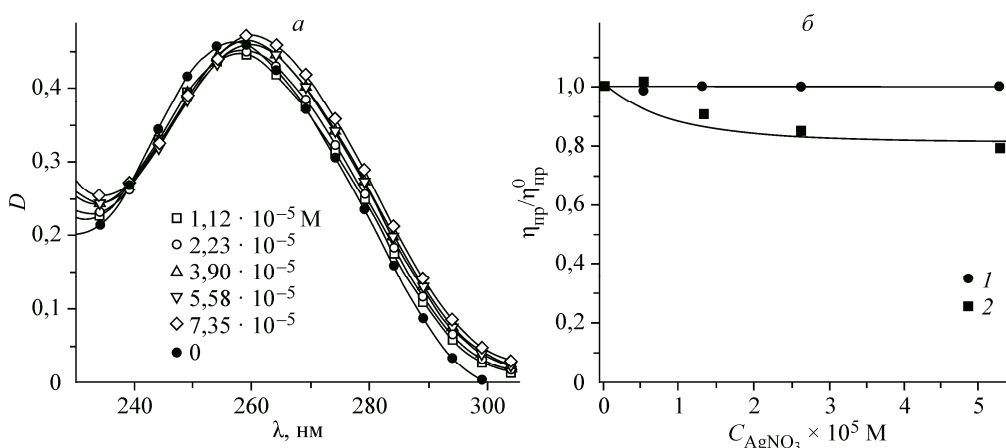


Рис. 2. Спектры УФ поглощения ДНК в комплексе с *цис*-ДДП в 0,005 М  $\text{NaCl}$ ,  $C_{\text{ДНК}} = 0,0022$  % (концентрации препарата даны на рисунке) (а); относительное изменение приведенной вязкости раствора ДНК от концентрации нитрата серебра в день приготовления растворов (1) и через сутки (2) при хранении их при температуре 4 °С,  $C_{\text{ДНК}} = 0,008$  % (б)

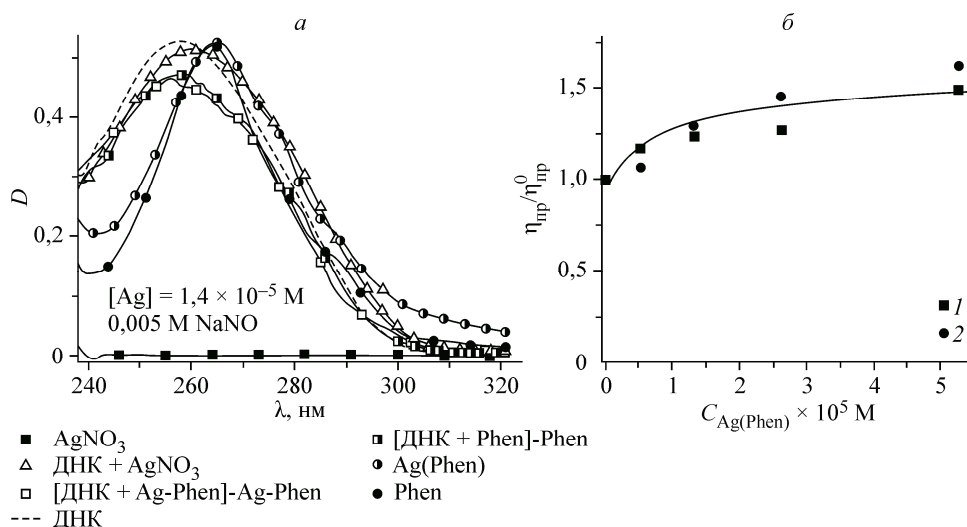


Рис. 3. Спектры поглощения (а) свободной ДНК и ДНК в комплексах с  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Ag}(\text{Phen})$  и с компонентом комплексного соединения фенантролином,  $\text{Phen}$ . Спектры ДНК в комплексах получены вычитанием вклада остальных компонентов взаимодействия, спектры которых также приведены на рисунке. Концентрации соединений подобраны таким образом, чтобы молярная концентрация серебра и ДНК была одинакова во всех сравниваемых системах (указана на рисунке). Приведена зависимость относительного изменения приведенной вязкости растворов ДНК от концентрации  $\text{Ag}(\text{Phen})$ , измеренная в день приготовления систем (1) и на следующий день (2) (б).  $C_{\text{ДНК}} = 0,008 \%$

ровать координационные связи. В частности, в работе мы использовали координационное соединение серебра с фенантролиновыми лигандами. В растворе комплексный ион  $[\text{Ag}(\text{Phen})_2]^+$  электростатически притягивается к отрицательно заряженной макромолекуле. При сближении компонентов формируется комплекс, который могут стабилизировать различные силы, в частности, ван-дер-ваальсовы. Характер комплексообразования и изменение конформационных характеристик ДНК при взаимодействии с  $\text{Ag}(\text{Phen})$  отличается от наблюдаемого для  $\text{Ag}^+$ . Заметим, что спектральный анализ образующихся комплексов затруднен, так как и ДНК, и соединение поглощают свет в одном частотном диапазоне (рис. 3).

Вместе с тем можно рассмотреть рассчитанные спектры ДНК в комплексах, исходя из предположения о неизменности спектров поглощения второго компонента комплексообразования (что в общем случае, безусловно, неверно). Тем не менее отличие вычисленного спектра поглощения ДНК при взаимодействии с рассматриваемыми соединениями от такового для свободной макромолекулы будет свидетельствовать о комплексообразовании. Рис. 3 демонстрирует, что спектральные изменения, фиксируемые при связывании ДНК с  $\text{Ag}^+$ , существенно отличаются от наблюдаемых при взаимодействии с  $\text{Phen}$  и  $\text{Ag}(\text{Phen})$ , тогда как комплексообразование с двумя последними соединениями сопровождается сходными спектрами поглощения ДНК. Можно предположить, что  $\text{Ag}(\text{Phen})$  взаимодействует с ДНК через один из фенантролиновых лигандов, что и определяет сходство спектров поглощения макромолекулы в составе соответствующих комплексов.

Следующий эксперимент, осуществленный методом вискозиметрии (рис. 4), также указывает на существенное различие комплексообразования ДНК с соединением  $\text{Ag}(\text{Phen})$  (графики 1, а и б) и с  $\text{Ag}^+$  (графики 2 и 3). Так как взаимодействие ДНК с  $\text{Ag}^+$ , в отличие от комплексов ДНК с  $\text{Ag}(\text{Phen})$ , через день после приготовления систем (график 3) проявляется более ярко, чем в первый день (график 2), приведены результаты двух дней измерений. На рис. 4 изображен результат изучения концентрационной зависимости ДНК в 0,005 М  $\text{NaNO}_3$  (график 4), а также комплексов ДНК с этими двумя агентами при двух способах разбавления базового раствора, содержащего приготовленные комплексы. Для всех систем измерения проводили в день приготовления и после выдержки базовых растворов 24 ч при температуре 4 °С для комплексов

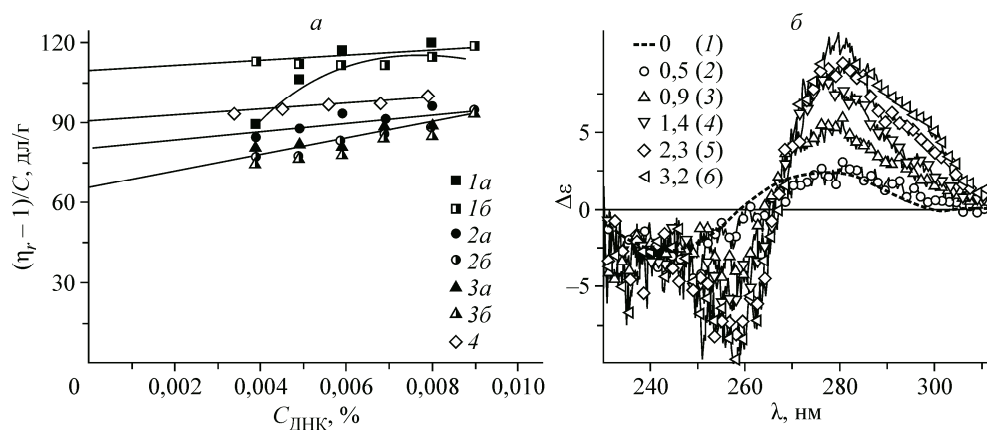


Рис. 4. Концентрационная зависимость приведенной вязкости растворов ДНК (а) в комплексе с  $\text{Ag(Phen)}$  (1), с  $\text{Ag}^+$  в день приготовления базового раствора (2) и через сутки (3), а также ДНК в 0,005 М  $\text{NaNO}_3$  (4) при двух способах разбавления базовых растворов: при  $C_{\text{Ag}}/C_{\text{ДНК}} = \text{const}$  (а) и  $C_{\text{Ag}} = \text{const}$  (б). Спектры КД ДНК в комплексе с  $\text{Ag(Phen)}$ ;  $C_{\text{ДНК}} = 0,0022\%$ ;  $C_{\text{Ag}} \cdot 10^{-5}$  М даны на рисунке (б)

ДНК с  $\text{Ag(Phen)}$ . Результаты двух дней измерений практически совпали. В день эксперимента были измерены приведенные вязкости этих базовых растворов для комплексов  $[\text{ДНК} + \text{Ag}^+]$  и  $[\text{ДНК} + \text{Ag(Phen)}]$  (точки на графике, соответствующие  $C_{\text{ДНК}} = 0,009\%$ ). Затем для уменьшения концентрации ДНК проводили последовательное разбавление, используя в качестве разбавителя раствор  $\text{NaNO}_3$  (первый тип разбавления, графики а), или раствор с концентрациями компонентов как в базовом, но вообще не содержащий ДНК (второй тип разбавления, графики б).

В первом случае в процессе разбавления сохраняется постоянным отношение концентраций  $[\text{Ag}^+]/[\text{ДНК}]$  или  $[\text{Ag(Phen)}]/[\text{ДНК}]$ , а во втором — концентрация связывающегося агента  $[\text{Ag}^+]$  или  $[\text{Ag(Phen)}]$ . При корректном разбавлении, не приводящем к изменению объема молекулярного клубка ДНК (при сохранении равновесия между фракциями связанных с ДНК и свободных агентов), экстраполяция концентрационной зависимости приведенной вязкости  $(\eta_r - 1)/C$ , где  $C$  — концентрация ДНК, к  $C = 0$  дает величину характеристической вязкости ДНК  $[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \left( \frac{\eta_r - 1}{C} \right)$ , которая связана с приведенным объемом молекулярного клубка  $V/M$ , с гидродинамической длиной макромолекулы  $L$  и ее жесткостью (длиной статистического сегмента  $A$ ) соотношением:  $[\eta] = \frac{\Phi(LA)^{3/2}}{M} \alpha^3$ , где  $\alpha$  — коэффициент линейного набухания клубка;  $\Phi$  —

параметр Флори. Отклонение зависимости от линейной означает нарушение равновесия в системе и невозможность оценить параметр  $[\eta]$ , что мы и наблюдаем для первого способа разбавления для системы  $[\text{ДНК} + \text{Ag(Phen)}]$ . Равновесное связывание препарата указывает на отсутствие координационной связи серебра в его составе с ДНК, энергия такой связи очень велика. Взаимодействие изменяет объем молекулы ДНК, что проявляется в день приготовления систем, а также на следующий день. В этом случае первый тип разбавления уменьшает концентрацию свободных лигандов в растворе, что приводит к быстрому падению вязкости. Второй тип разбавления добавляет препарат в раствор, происходит дополнительное связывание, вязкость возрастает.

Для комплексов ДНК с  $\text{Ag}^+$  наблюдается иная картина. В день приготовления систем (графики 2а и 2б на рис. 4) два способа разбавления приводят к разному значению  $[\eta]$ , но с течением времени (после суток хранения базового раствора) результаты измерений для двух способов разбавления совпадают, что указывает на то обстоятельство, что заведомое нарушение соотношения между связанными и свободными ионами серебра не приводит к изменению объема молекулярного клубка. Ионы связаны "прочно". Сравнение показывает, что связывание ДНК с  $\text{Ag(Phen)}$  приводит к возрастанию вязкости ее растворов, а с  $\text{Ag}^+$  — падению. Это в полной



мере следует из зависимости приведенной вязкости растворов ДНК одной концентрации от концентрации взаимодействующих с ней лигандов (см. рис. 2, б и 3, б).

Принято считать, что увеличение вязкости растворов ДНК, содержащих соединения с гетероциклическими лигандами, свидетельствует об их интеркаляционном способе связывания из-за удлинения гидродинамической длины макромолекулы  $L$ , хотя одни только такие данные и не являются прямым доказательством этого типа взаимодействия. Вместе с тем эксперимент показал, что взаимодействие менее сильное, чем для комплексов  $\text{Ag}^+$ —ДНК, это взаимодействие затрагивает азотистые основания макромолекулы (см. результаты, представленные на рис. 3, а, указывающие, что в связывании участвуют хромофоры ДНК — ее азотистые основания). Кроме того, об этом свидетельствует и изменение спектров КД ДНК в комплексе с соединением (см. рис. 4, б).

Известно, что после связывания с молекулой ДНК ионов серебра и их последующего восстановления на макромолекуле могут возникнуть люминесцирующие кластеры серебра (рис. 5, а), состоящие из ассоциатов до 20 атомов серебра [12], или серебряные наночастицы, обладающие выраженным эффектом плазмонного резонанса с появлением характерной узкой полосы в спектре поглощения растворов (около 400 нм), при этом раствор имеет желтый оттенок (см. врезку на рис. 5, а). Опыт показал, что для появления нанокластеров практически все ионы серебра должны быть связаны с макромолекулой. При существенной фракции свободных ионов в растворе идет преимущественно формирование наночастиц (при наличии пика плазмонного резонанса люминесценции не наблюдается). Для роста нанокластеров существенно, чтобы ионы серебра, которые выступают как точки роста, достаточно прочно были фиксированы на макромолекуле (электростатическое взаимодействие с фосфатными группами не обеспечивает таких условий).

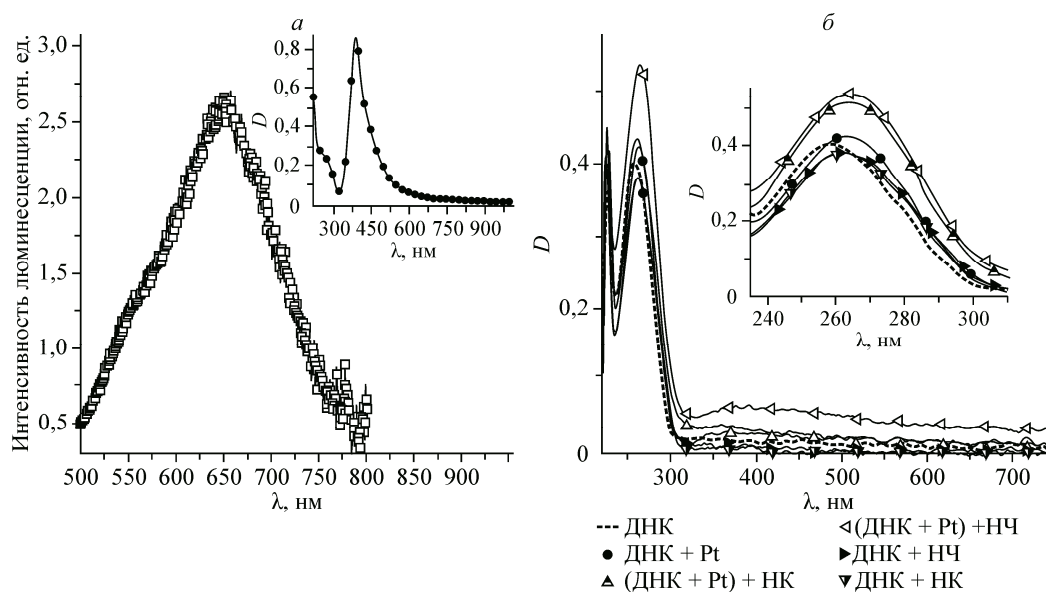


Рис. 5. Спектр люминесценции нанокластеров серебра на ДНК,  $\lambda_{\text{ex}} = 270$  нм,  $C_{\text{ДНК}}$  (0,00186 %),  $\text{AgNO}_3$  ( $2,4 \cdot 10^{-5}$  М),  $\text{NaBH}_4$  ( $10^{-5}$  М) и  $\text{KMnO}_4$  ( $10^{-6}$  М), на врезке — пик плазмонного резонанса, соответствующий появлению наночастиц серебра (а). Спектр поглощения растворов ДНК с  $\text{AgNO}_3$  (обозначено Ag) с последующим восстановлением до нанокластеров (НК), фиксируемых по появлению люминесценции, или наночастиц (НЧ), имеющих пик плазмонного резонанса. Приведены данные для попытки восстановления серебра при использовании сформированных комплексов ДНК с *цис*-ДДП (обозначено как Pt); приведены спектры поглощения ДНК, ДНК с *цис*-ДДП, комплекс ДНК+*цис*-ДДП (растворы выдерживали сутки) с последующим добавлением ионов серебра и попыткой их восстановления до нанокластеров, ДНК с НК, комплекс ДНК+*цис*-ДДП с последующим добавлением готовых наночастиц (НЧ), ДНК с НЧ. Для всех систем:  $C_{\text{ДНК}} = 0,002$  %,  $C_{\text{Pt}} = 5 \cdot 10^{-5}$  М; для приготовления НК:  $\text{AgNO}_3$  —  $2,4 \cdot 10^{-5}$  М,  $C_{\text{NaBH}_4} = 10^{-5}$  М,  $C_{\text{KMnO}_4} = 10^{-6}$  М. При тех же концентрациях реагентов в отсутствие ДНК образуются НЧ (б)

Следующий эксперимент показал важность образования устойчивых комплексов ионов серебра с группой N7 гуанина для успешной металлизации ДНК (см. рис. 5, б). Известно, что соединение *цис*-ДДП образует координационную связь с ДНК по N7 гуанина [13]. Эта позиция важна и для связывания ионов серебра с азотистыми основаниями макромолекулы. Мы приготовили комплекс ДНК с *цис*-ДДП [13], который и использовали для металлизации серебром наряду со свободной ДНК (контрольный раствор).

Опыт показал, что *цис*-ДДП блокирует места посадки ионов серебра. Последующее его восстановление не приводит к формированию кластеров (люминесценции нет). В таком растворе не формируются и наночастицы серебра. Только когда восстановление серебра проходит в растворе, где нет ДНК, при используемых концентрациях реагентов формируются наночастицы. При добавлении нитрата серебра в раствор после формирования комплексов ДНК с *цис*-ДДП с последующим восстановлением ионов серебра виден выраженный пик плазмонного резонанса, см. (ДНК+Pt)+НЧ на рис. 5, б, тогда как при попытке формирования НК в таких растворах, когда используются меньшие концентрации нитрата серебра ((ДНК+Pt)+НЧ), а также в случае формирования НЧ в растворе ДНК без *цис*-ДДП (ДНК+НЧ) виден менее выраженный пик.

Таким образом, анализ данных показывает, что как для роста наночастиц, так и для роста нанокластеров серебра предварительное связывание ДНК с *цис*-ДДП не является удобным. Только когда готовые наночастицы добавляются к комплексу ДНК с *цис*-ДДП, мы видим размытый плазмонный пик. Люминесценции в таких системах также не наблюдается. Если наночастицы еще могут образовываться вне ДНК, то для кластеров это исключено. Соответственно, полученные результаты показывают, что позиция N7 гуанина является принципиальной для синтеза нанокластеров. Причем ионы серебра должны образовать координационную связь с атомом азота гуанина. Если эта позиция недоступна для связывания, ионы серебра находятся вблизи фосфатных групп (их заряда недостаточно для образования устойчивого комплекса). Серебро восстанавливается вне ДНК. Действительно, плазмонный пик наблюдается только тогда, когда к комплексу ДНК с цисплатином добавляются готовые наночастицы. Таким образом, для металлизации ДНК необходимо предварительное связывание ионов металла с макромолекулой, причем энергия связывания должна быть много больше  $kT$  (наилучшим вариантом является координационная связь).

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 13-03-01192А) и СПбГУ (грант 11.37.290.2015).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Himuro T., Araki R., Ikedo H., Sato S., Takenaka S., Yasuda T. // Proceed. 17th Internat. Conf. Miniaturized Systems for Chemistry, Life Sciences ( $\mu$ TAS 2013)// – 2013. – **10**. – P. 27 – 31.
2. Yogeswaran U., Chen S.-M. // Sensors. – 2008. – **8**. – P. 290 – 313.
3. Lal S., Link S., Hala N.J. // Nature Photonics. – 2007. – **1**. – P. 641 – 648.
4. Taton T.A., Mirkin C.A., Letsinger R.L. // Science. – 2000. – **289**. – P. 1757 – 1760.
5. Cao Y.C., Jin R., Mirkin C.A. // Science. – 2002. – **297**. – P. 15361540.
6. Zhang J., Malicka J., Gryczynski I., Lakowicz J.R. // J. Phys. Chem. B. – 2005. – **109**. – P. 7643 – 7648.
7. Puchkova A.O., Sokolov P.A., Petrov Y.V., Kasyanenko N.A. // J. Nanoparticle Res. – 2011. – **13**. – P. 3633 – 3641.
8. Касьяненко Н.А., Дьяконова Н.Е., Фрисман Э.В. // Молек. биол. – 1989. – **23**. – С. 835 – 841.
9. Yamane T., Davidson N. // Biochim. Biophys. Acta. – 1962. – **55**. – P. 609 – 621.
10. Menzer S., Sabat M., Lippert B. // J. Am. Chem. Soc. – 1992. – **114**. – P. 4644 – 4649.
11. Arya S.K., Yang J.T. // Biopolymers. – 1975. – **14**. – P. 1847 – 1861.
12. Volkov I.L., Ramazanov R.R., Ubyvovk E.V., Rolich V.I., Kononov A.I., Kasyanenko N.A. // ChemPhysChem. – 2013. – **15**. – P. 3543 – 3550.
13. Fichtinger-Schepman A.M., van der Ver J.L., Lohman P.H.M., Redijk J. // J. Inorg. Biochem. – 1984. – **21**. – P. 103 – 112.