

MEMBRÁN ALKOTÓRÉSZEK KOMPLEXKÉPZŐ TULAJDONSÁGÁNAK VIZSGÁLATA

CSERHÁTI TIBOR és SZŐGYI MÁRIA

Növényvédelmi Kutató Intézet
és Semmelweis Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézet, Budapest

Bevezetés

A biológiai membránokban lejátszódó jelenségek számos molekuláris szinten lezajló kémiai és fizikai természetű részfolyamatból tevődnek össze. A membránok működésének, a transzportfolyamatok mechanizmusának megértéséhez, továbbá a biológiailag fontos vegyületek, valamint a membránreceptorok között lezajló reakciók megismerése érdekében szükség van a részfolyamatok tanulmányozására. A membránreceptor és antibiotikum közötti kölcsönhatás vizsgálatát azonban rendkívül megnehezíti az a tény, hogy teljes biztonsággal nem ismerjük a receptorhely kémiai természetét. Az antibiotikum molekulák és a baktériumok felszínén levő kötőhelyek (feltehetően fehérjék perifériás aminosav maradékai, lipidek poláros és apoláros csoportjai stb.) közötti reakció létrejöhet kémiai kötés kialakulásával, van der Waals-erők stb. révén (ALLISON 1968, VANDENHEUVEL 1971, VRANSKY 1975).

A polimixin kémiailag bázikus polipeptidnek tekinthető, a molekula hidrofil és hidrofób csoportokat egyaránt tartalmaz. Modern mérési eljárások (NMR, ESR spektroszkópia stb.) segítségével a polimixin és a membrán komponensek közötti kölcsönhatás részletesebb vizsgálata vált lehetővé. BARRETT-BEE és munkatársai (1972) *E. coli*-val, ill. membrán frakciókkal végzett kísérleteik alapján kimutatták, hogy a polimixin a membrán foszfolipid komponenseivel lép kölcsönhatásba. ANAND és munkatársai (1960), ENGELBERG és ARTMAN (1962) véleménye szerint a felvétel első fázisában a sztreptomycin kationos jellegénél fogva (bázikus aminoglikozid) a sejt negatív töltésű receptoraival elektrosztatikus kölcsönhatásba lép.

Számos irodalmi adat utal arra, hogy a sztreptomycin és polimixin bakteriosztatikus hatása jelentős mértékben csökken, ha a táptalajban kationok is vannak (HANCOCK 1962, HURWITZ, ROSANO 1962, KAVANAGH 1963, DAVIS és munkatársai 1969, VENIS 1969, PACHE, ZÄHNER 1969). PITTINGER és ADAMSON (1972) antibiotikum molekulák (sztreptomycin, polimixin, neomicin) és anorganikus ionok között kompetíciót figyelt meg idegvégződéseken lévő receptorhelyek elfoglalásáért. TAMÁS és munkatársai (1974) azt tapasztalták,

hogy a táptalajhoz adott egy-, ill. kétértékű ionok koncentrációjának növekedésével csökken az *E. coli* sejtek sztreptomycin felvétele.

Munkánk kidolgozásával a fenti megfigyelések magyarázatához kívántunk adatokat szolgáltatni.

Vizsgálati anyagok és módszerek

Vizsgálatainkhoz modellként a membránok foszfolipid komponensei közül a lecitint (Koch—Light-gyártmány) és a fenti antibiotikumokra érzékeny *Bac. subtilis* törzset választottuk. A lecitin homogenitását vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel vizsgáltuk: 60 μg lecitint felesőppentve *n*-butanol : ecetsav : víz 10 : 1 : 3 térfogatarányú keverékének szerves fázisával futtattunk. Szárítás után a lemez egyik felét a kolin csoportra jellemző Dragendorff-reagenssel, a másik felét 50%-os kénsavval fújtuk be a szennyezők kimutatása céljából.

A kötődés vizsgálatánál abból a feltevésből indultunk ki, hogy ha a lecitin vagy egyéb hasonló jellegű foszfolipid a baktériummembránban szerepet játszik az antibiotikum megkötésében, akkor a baktérium—antibiotikum rendszerhez adott lecitin kompetitív módon gátolja az antibiotikum bakteriosztatikus hatását. Amennyiben kationok csökkentik az antibiotikum hatást, az antibiotikum—lecitin komplexhez adott kationnak lecitinhez való kötődése révén antibiotikumot kell szabaddá tennie.

A fenti munkahipotézist elsősorban *in vivo* körülmények között, agar-diffúziós módszerrel vizsgáltuk. Az antibiotikumot, majd az antibiotikum és lecitin, antibiotikum—lecitin—kation különböző molekularányú keverékét inkubáltuk és mértük a látszólagos szabad antibiotikum mennyiségét.

In vitro kísérleteinket molekulaszűrősen alapuló eljárással vizsgáltuk, mivel ez a módszer lehetőséget nyújt makromolekulák molekulasúlyának meghatározására (DETERMANN, MICHEL 1966, LEACH, O'SHEA 1965, ACKERS 1968), vagy más módszerrel nyert molekulasúly értékkel történő összehasonlításból következtetések vonhatók le a molekula alakjára (KREMMER, BOROSS 1974).

A fentiek alkalmassá teszik a gélkromatográfiát komplexképzési folyamatok tanulmányozására is. A komplex elúciós tulajdonságai — a megváltozott molekulasúly (esetleg molekulaalak) következtében — eltérők a komplex alkotórészeinek tulajdonságaitól (COOPER, WOOD 1968, WOOD, COOPER 1970). Amennyiben az egyik komplexképzőt az eluenshez keverjük és koncentrációját mérjük az elúció során, ha a komplex tényleg létrejön, a koncentrációja megnő ott, ahol a másik komponens megjelenik az eluátumban, ill. utána ennek megfelelően csökkenni fog (HUMMEL, DREYER 1962).

Kísérleteinkben a lecitin polimixinnel és sztreptomocinnel képezett komplexeit tanulmányoztuk a fenti elvek felhasználásával. A komplexképzés

létrejöttének vizsgálatához $1,5 \times 16$ cm-es Sephadex G 25 oszlopot használtunk. Eluensként az antibiotikumot és lecitint egyaránt oldó 60%-os etilalkohol tartalmú, 6,6 pH értékű 0,02 M nátriumacetát pufferoldatot használtunk. A frakció térfogatot 1,5 ml-nek, az elúciós sebességet 0,5 ml/percnek választottuk. Ellenőriztük a gél eluens kötőképességét, mivel az etilalkohol jelenléte a duzzadóképeséget várhatóan befolyásolja.

A polimixin—lecitin komplex tanulmányozásánál először tiszta polimixint vittünk fel az oszlopra 0,8—2,4 mg mennyiségben, majd a frakciók extinkció értékét mértük 230 nm-en. Az elúciós térfogat ismeretében meghatároztuk a polimixin molsúlyára jellemző volumetrikus megoszlási hányadosát:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_k}{V_t - V_k},$$

ahol V_e az elúciós térfogat, V_t az oszlop teljes térfogata, V_k az oszlopban az eluens által elfoglalt térfogat $\approx 0,33 V_t$.

A vizsgálatokat tiszta lecitinnel is elvégeztük. A polimixin és lecitin 1 : 0,5; 1 : 0,75; 1 : 1 és 1 : 6 molarányú keverékét kromatografáltuk és mértük a frakciók extinkcióját 230 nm-en. A polimixin elúciós térfogatától eltérő helyen lejövő, feltételezeten a komplexet tartalmazó frakciót a polimixin és lecitin szétválasztása céljából ugyanolyan térfogatú kloroformmal kiráztuk, a kloroformos fázist szárazra pároltuk és felvettük a maradék infravörös színképét. A vizes fázishoz az IR felvételt zavaró acetát-ion eltávolítása céljából 1,5 ml 0,1 N HCl oldatot adtunk, majd szobahőmérsékleten szárazra pároltuk és a maradékból szintén IR felvételt készítettünk. A további azonosítás céljából a frakciót szilikagél lemezen n-butanol : ecetsav : víz 10 : 1 : 3 térfogatarányú keverékének szerves fázisával futtattuk, majd a lemez felét 0,2%-os alkoholos ninhidrin oldattal történő bepermetezés után 120 °C-on a polimixin, másik felét Dragendorff-reagenssel fújtuk be a lecitin kimutatására.

A sztreptomycin komplexképző tulajdonságainak vizsgálatára a fentiekben ismertetett kísérleteket végeztük el, csupán a sztreptomycin mennyiségi meghatározására alkalmaztuk a VI. Magyar Gyógyszerkönyv előírásain alapuló, de kísérleti körülményeinknek megfelelően módosított módszert: minden frakcióhoz 0,3 ml N NaOH oldatot adtunk, 15 percig 70—75 °C hőmérsékleten tartottuk, lehűtöttük, majd hozzáadtunk 0,3 ml 3%-os $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2$ oldatot, a keletkező vörös szín intenzitását mértük 540 nm-en.

A komplexek várható molekulásúlyának ismeretében a molekulásúlyt a G 25-ös oszloppal azonos méretű Sephadex G 50 oszlopon kívántuk meghatározni a fenti kísérleti feltételek mellett PolLec, PolLec₆, SztrLec₃ összetételű komplexek felvitelével.

A gélkromatográfiás vizsgálatoknál a lecitin és a lecitin—polimixin komplex anomáliás viselkedése szükségessé tette a kritikus micella-koncentráció meghatározását, mely fölött az anyag feltehetően molekula asszociátumokat képez. A vizsgálatokat 22 °C hőmérsékleten végeztük el viszkoziméteres mérésekkel lecitint, polimixint, ill. PolLec₆ komplexet tartalmazó oldatokkal 0,001—0,05% koncentráció tartományban. A lecitin oldatokat elkészítésük után közvetlenül, majd 24 és 48 óra múlva is mértük.

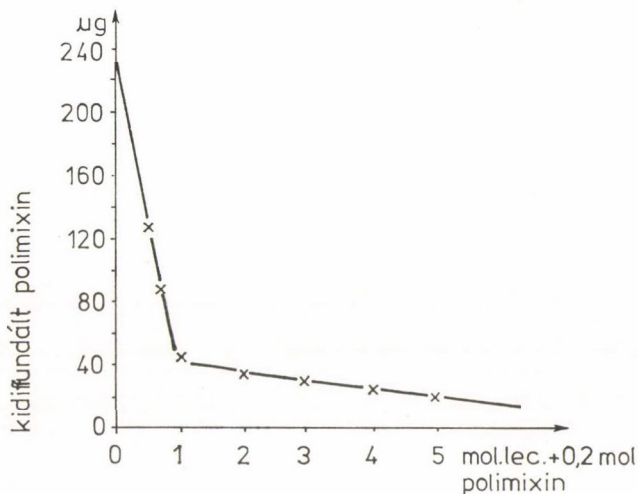
A lecitin komplexek létrejöttét potenciometrikus módszerekkel is vizsgáltuk, felvettük a tiszta lecitin és polimixinnel, sztreptomocinnel, szerinnel, Zn, Mg, Na, K, Cs és Li ionnal képezett komplexének potenciometrikus görbéjét. A vizsgálatokat Metrohm-gyártmányú automata titriméterrel végeztük 60%-os etilalkoholban. Azonos koncentrációarányok mellett a lecitin és komplexe titrálási görbéjének eltérése felvilágosítást nyújt a komplex stabilitására.

Eredmények és értékelésük

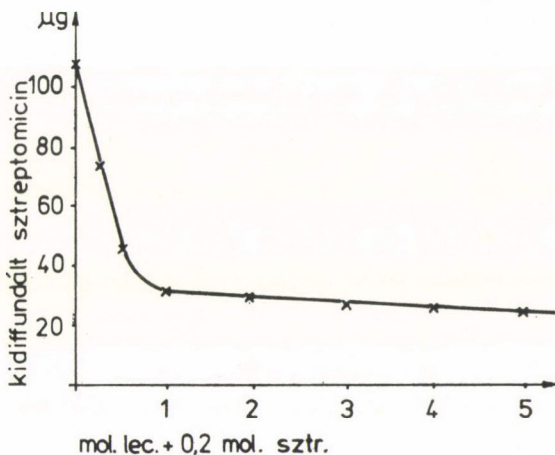
A lecitin homogenitás vizsgálatánál megállapítottuk, hogy a Koch-Light-gyártmányú lecitin egyetlen, Dragendorff-reagenssel reagáló foltot ad, a kén-savas előhívással sem tudtuk a lemezen egyéb anyag jelenlétét kimutatni.

Az agardiffúziós módszerrel nyert jellegzetes görbék közül kettőt az 1. és 2. ábrán mutatunk be.

Az ábrákból kitűnik, hogy lecitin hozzáadása rendkívüli módon csökkenti az antibiotikumok baktériummembrán által hozzáférhető mennyiségét. A hatásgátlás az antibiotikum és lecitin között létrejövő komplexképződéssel magyarázható. Megállapítható továbbá, hogy a görbék az 1 : 5 molarány tartományban törést mutatnak, meredekségük fokozatosan csökken, nagyobb molarányok esetén a molarány és a kidiffundált antibiotikum mennyisége között újra lineáris összefüggés mutatható ki. Vizsgálatainkból az a következtetés vonható le, hogy a lecitin a polimixinnel és sztreptomocinnel molarányától függően polimixin—lecitin_x, ill. sztreptomocin—lecitin_x összetételű komplexet képez. A maximális ligandumszám (x maximális értéke) a görbék töréspontjából meghatározható: polimixin esetében $x = 5$ vagy 6, sztreptomocinnél $x = 4$ vagy 5. A komplexek stabilitási állandóinak alapján azonban a mértnél egy nagyságrenddel kisebb kidiffundált antibiotikum mennyiséget kellett volna kapnunk, ez a látszólagos antibiotikum mennyiségváltozás a molekulasúlyok különbségével nem magyarázható. Az eltérés okát abban látjuk, hogy a különböző összetételű komplexek nagyobb molekulasúlyuknak megfelelően kisebb sebességgel, de bediffundálnak az agarlemezbe. A baktériummembrán receptorhelyein és a komplexben az antibiotikum kémiai potenciáljának azonosnak kell lennie. Amennyiben feltételezzük, hogy a membrán receptorhely és a lecitin „kémiai affinitása” az antibiotikumokhoz azonos, természetesen mennyi-



1. ábra. Kidiffundált polimixin mennyiségének csökkenése lecitin jelenlétében (kiindulási polimixin mennyiség 240 µg)



2. ábra. Kidiffundált sztreptomycin mennyiségének csökkenése lecitin jelenlétében (kiindulási mennyiség 108 µg)

ségük 1 : 1 arányban oszlik meg a membrán receptorhelyek és a lecitin között. A tényleges megoszlást kötéseerősségük aránya mellett koncentráció viszonyaik is meghatározzák. A receptorhelyek számának, valamint a komplex diffúziós állandójának segítségével számolt koncentrációjának és a komplex stabilitási állandójának ismeretében lehetőség nyílik a receptorhelyek kötéseerősségének meghatározására.

Kationos kísérleteink két jellemző sorozatának eredményét az 1. táblázatban foglaltuk össze:

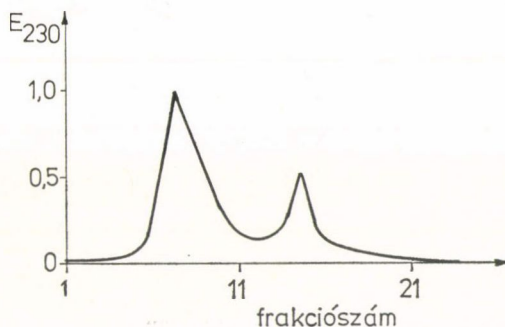
1. táblázat
Antibiotikum—lecitin—kation komplexek

Összetétel	Molarány	Mérhető antibiotikum mennyiség (μg)
Polimixin		240
Polimixin : Lecitin	1 : 5	64
Polimixin : Lecitin : Zn	1 : 5 : 1	150
Polimixin : Lecitin : Mg	1 : 5 : 5	125
Sztreptomycin		108
Sztreptomycin : Lecitin	1 : 5	29
Sztreptomycin : Lecitin : Zn	1 : 5 : 1	38
Sztreptomycin : Lecitin : Mg	1 : 5 : 5	33

Az adatokból megállapítható, hogy a kationok szintén képesek a lecitinnel komplexet képezni, ezért feltehetően az alábbi egyensúlyi reakció játszódik le kétértékű kationok jelenlétében: $2 \text{ AntibiotikumLecitin}_x + \text{Me} \rightleftharpoons 2 \text{ AntibiotikumLecitin}_{x-1} + \text{MeLecitin}_2$. Egyértékű kationok hozzáadása esetén pedig: $\text{AntibiotikumLecitin}_x + \text{Me} \rightleftharpoons \text{AntibiotikumLecitin}_{x-1} + \text{MeLecitin}$ reakció megy végbe. Az egyensúlyt mindenkor moláris koncentrációik és komplex stabilitási állandóik aránya szabja meg. A látszólagos szabad antibiotikum mennyiség növekedés oka a kisebb ligandumszámú, nagyobb mozgékonyaságú és kevésbé stabilis komplex keletkezése. A táblázat adataiból látható, hogy a cink a lecitinnel körülbelül azonos, a magnézium közelítőleg egy nagyságrenddel kisebb erősségű komplexet képez, mint az antibiotikumok. A biológiai kísérletekben igazolt komplex létrejöttének kémiai vizsgálatok az alábbi eredményeket kaptuk: a száraz Sephadex gél duzzadóképeségét vizsgálva megállapítottuk, hogy a vízre, ill. vizes puffer rendszerekre megadott 2,5 ml/g száraz gélérték az általunk alkalmazott pufferben 2,1 ml/g értékre csökkent. A duzzadóképeség csökkenése maga után vonhatja a pórusméretek megváltozását, ezért a számított volumetrikus megoszlási hányadosokból (kalibráló globuláris fehérjék hiányában) a molekulák alakjára felvilágosítást nem tudunk nyerni. A polimixin K_{av} értékét 0,54-nek találtuk, a tiszta lecitin azonban kisebb molsúlya ellenére a kizáródási térfogatban jelent meg, azaz látszólagos molsúlya 1500-nál nagyobbak adódott. A polimixin—lecitin komplex vizsgálatára jellemző kromatogramot mutatunk be a 3. ábrán.

Az 1 : 0,5 és 1 : 0,75 polimixin—lecitin molekularányoknál a kromatogramon két csúcsot kaptunk, a kizáródási térfogatban a komplex, $K_{av} = 0,54$

értéknek megfelelő eluens térfogatban pedig a polimixin jelent meg. 1 : 1 molekulaarányánál azonban a polimixin csúcsa megszűnt, az összes polimixin a lecitinnel együtt a kizárási térfogatnál lejjövő frakcióba került.



3. ábra. A polimixin—lecitin komplex vizsgálatára jellemző kromatogram

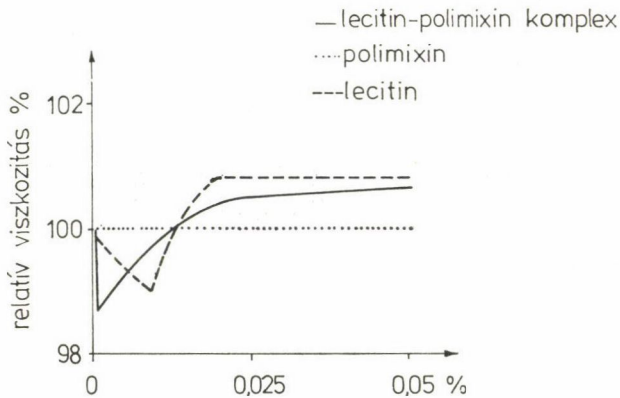
A kizárási térfogatnál megjelenő frakcióban mind vékonyréteg-kromatográfiás, mind IR módszerrel a lecitin és polimixin azonosítható volt. A sztreptomycin vizsgálatánál a tiszta sztreptomycin elnyúló mezőben $K_{av} = 0,54—1,04$ megoszlási hányados értékek között eluálódott. Viselkedését e rendszerben mutatott csekély oldhatósága nem igazolja, nem képezett a lecitinnel komplexet, ezért arra a megállapításra jutottunk, hogy a sztreptomycin a hasonló szerkezetű dextrán géllal reakcióba lép, így a Sephadex-gyanták nem alkalmasak sztreptomycin—lecitin komplex tulajdonságainak tanulmányozására. A Sephadex G 50-es oszlopon végzett kísérleteinknél a lecitin, a PolLec és a PolLec₆ komplexek egyaránt a kizárási térfogatban találhatóak, tehát látszólagos molekulásúlyuk tízezer fölötti, ami molekula asszociátumok képződésére utal.

A viszkozitás változásokra nyert adatainkat a 4. ábrán ismertetjük. Az adatok arra engednek következtetni, hogy a 0,001—0,01% koncentráció felett a lecint, ill. a komplexet tartalmazó oldatokban aggregálódási jelenségek lépnek föl, melyek 0,02% koncentráció körül befejeződnek. A lecitin oldatok időbeli vizsgálatából megállapítható volt, hogy a viszkozitás-görbe minimum-pontja kisebb koncentrációk felé tolódik el, ebből a kisebb koncentrációk esetén lassabban lejátszódó aggregálódási, öregedési folyamatokra következtünk. A viszkozitás mérés átlagszórását: $s = 0,29\%$ -nak találtuk.

A potenciometrikus titrálásokkal nyert eredményeinket az 5—9. ábrákon mutatjuk be. A potenciometrikus mérések átlagos szórása: $s = 0,003$ ml.

Biológiai kísérleteinkkel jó egyezésben megállapítható, hogy a cink a magnéziumnál lényegesen erősebb komplexképző tulajdonságú, az egyértékű kationok sorrendje $Na > Li > Cs > K$. A polimixin erősebben kötődik a lecitinhez, mint a sztreptomycin.

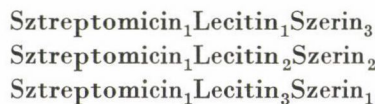
A receptorhely közelebbi megismeréséhez segíthet hozzá az a 8. és 9. ábráról leolvasható megállapítás, hogy a membránfehérjék alkotóelemei közül a szerin a lecitinnel komplexet képez, ami ismét valószínűsíti a receptorhely fehérje—lipid összetételű komplex jellegét. Megerősíti továbbá ezt a feltételezésünket a szerin és sztreptomycin között is fellépő komplexképződés.



4. ábra. A lecitin, polimixin és a lecitin—polimixin oldatok relatív viszkozitása

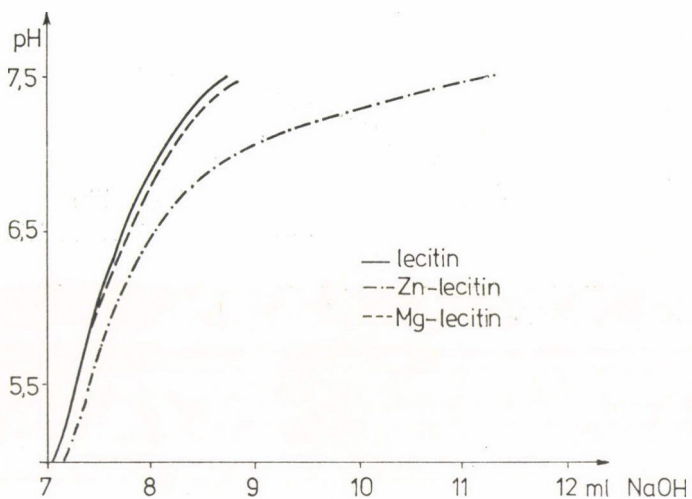
A lecitin—sztreptomycin telített ligandumszámú komplexéhez szerint téve a potenciometrikus görbe lecitin—sztreptomycin—szerin vegyes terner komplex képződését mutatja (10. ábra), tehát a vegyes komplex termodinamikailag stabilabb, képződési valószínűsége nagyobb, mint a lecitin—sztreptomycin komplexé.

Adatainkból nem állapítható meg a vegyes komplex összetétele, ugyanis a nagy ligandumszám miatt:

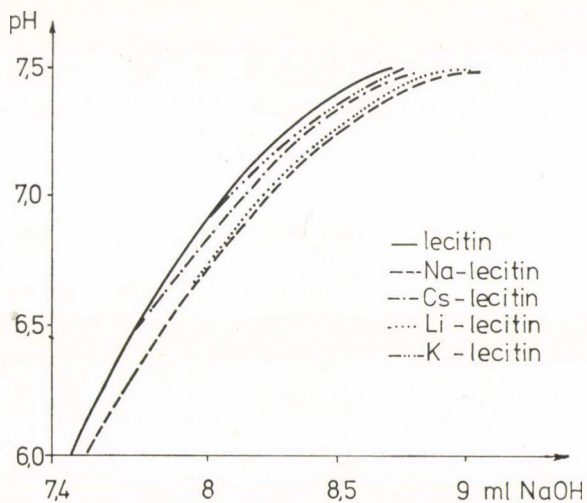


létrejövő mellett a maximális ligandumszámú biner és kisebb ligandumszámú biner és terner komplexek esetleges jelenléte a számításokat rendkívül bonyolulttá teszi.

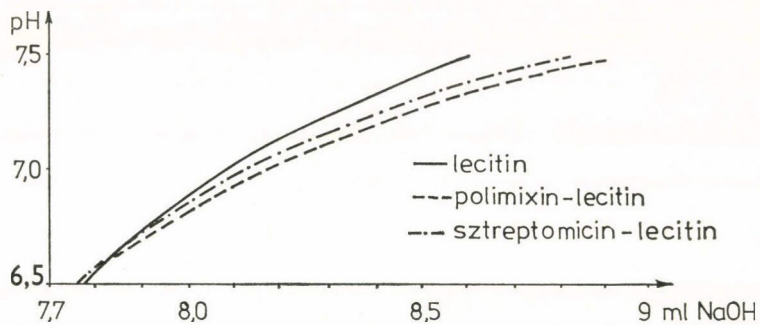
Adatainkból arra következtetünk, hogy a membrán receptorhely az antibiotikummal nem egy kötést létesít, a kötésekben részt vevő membrán alkotórészek különbözők, részben lipid, részben fehérje jellegűek lehetnek, az így létrejövő membrán-antibiotikum kölcsönhatás jobban biztosítja az antibiotikum feldúsulását a baktériummembránon, mint az egyszerű lipid-antibiotikum kötés.



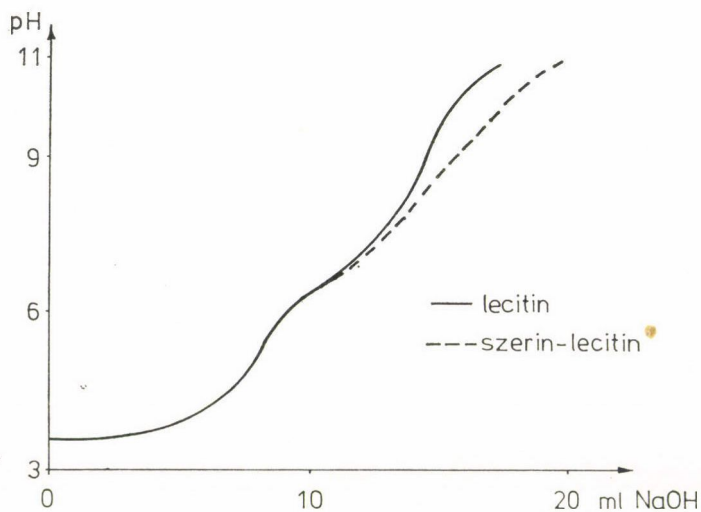
5. ábra. Lecitin kétértékű kationokkal alkotott komplexének potenciometrikus görbéi



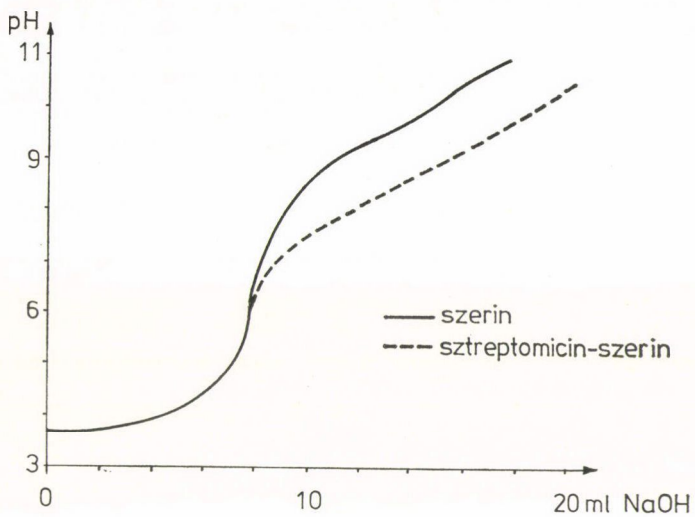
6. ábra. Lecitin egyértékű kationokkal alkotott komplexének potenciometrikus görbéi



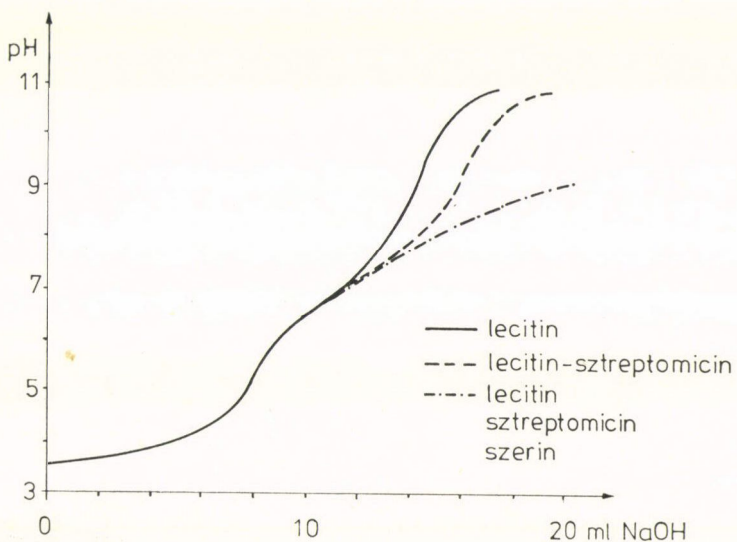
7. ábra. Lecitin antibiotikumokkal alkotott komplexének potenciometrikus görbéi



8. ábra. Lecitin—szerin komplex potenciometrikus görbéje



9. ábra. Szerin—sztreptomycin komplex potenciometrikus görbéje



10. ábra. Lecitin—sztreptomycin—szerin terner komplex potenciometrikus görbéje

Összefoglalás

Vizsgáltuk a polimixin és sztreptomycin lecitinhez való kötődését. Megállapítottuk, hogy a lecitin jelenlétében a fenti antibiotikumok bakteriosztatikus hatása csökken, ez a gátlás kationok adagolásával visszaszorítható. A jelenség az antibiotikumok és lecitin, ill. lecitin és kationok közötti komplex képződésével magyarázható. Vizsgálataink alapján feltételezzük, hogy a receptorhely lipid—fehérje komplex jellegű lehet, mely az antibiotikummal terner komplexet hoz létre.

IRODALOM

1. ACKERS, G. K.: Molecular sieve studies of interacting protein systems II. Enumeration of components and determination of molecular size distributions. *J. Biol. Chem.* **243**, 2056 (1968).
2. ALLISON, A. C.: Effects of pharmacologically active compounds on membranes. *British Medical Bulletin* **24**, 135 (1968).
3. ANAND, N., B. D. DAVIS, H. K. ARMITAGE: Uptake of streptomycin by *Escherichia coli*. *Nature* **185**, 23 (1960).
4. BARRETT-BEE, K., G. K. RADDA, N. A. THOMAS: Mitochondria, Biomembranes. Eight FEBS Meeting, Amsterdam North Holland American Elsevier p. 231 (1972).
5. COOPER, P. F., G. C. WOOD: Protein-binding of small molecules: New gel filtration method. *J. Pharm. Pharmacol.* **20**, (Suppl.) 150 S (1968).
6. DAVIS, B., D. DULBECCO, H. N. EISEN, H. S. GINSBERG, W. B. WOOD: *Microbiology*, Harper Int. Ed. p. 301 (1969).
7. DETERMANN, H., W. MICHEL: The correlation between molecular weight and elution behaviour in the gel chromatography of proteins. *J. Chromatog.* **25**, 303 (1966).
8. ENGELBERG, H., M. ARTMAN: Studies on streptomycin-dependent bacteria: uptake of ^{14}C -streptomycin by a streptomycin-dependent mutant of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **54**, 533 (1962).
9. HANCOCK, R.: Uptake of ^{14}C -streptomycin by *Bacillus megaterium*. *J. Gen. Microbiol.* **28**, 503 (1962).
10. HUMMEL, J. P., W. J. DREYER: Measurement of protein-binding phenomena by gel filtration. *Biochim. Biophys. Acta* **63**, 530 (1962).
11. HURWITZ, C., ROSANO: Accumulation of label from ^{14}C -streptomycin by *E. coli*. *J. Bact.* **83**, 1193 (1962).
12. KAVANAGH, F.: *Analytical Microbiology*. Acad. Press. New York, London p. 61 (1963).
13. KREMMER T., BOROSS L.: *Gélkromatográfia*. Műszaki Könyvkiadó Bp. 73 (1974).
14. LEACH, A. A., P. C. O'SHEA: The determination of protein molecular weights. *J. Chromatog.* **17**, 245 (1965).
15. PACHE, W., H. ZÄHNER: Bindung von Antibiotica an Lipoprotein. *Arch. Mikrobiol.* **66**, 281 (1969).
16. PITTINGER, Ch., R. ADAMSON: Antibiotic blockade of neuromuscular function. *Ann. Rev. Pharmacol.* **12**, 169 (1972).
17. TAMÁS, Gy., M. SZÓGYI, I. TARJÁN: Effect of various metal ion on the streptomycin uptake of *E. coli* B cells. *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **9**, 107 (1974).
18. VANDENHEUVEL, F. A.: Structure of membranes and role of lipids therein. *Adv. in lipid research* **9**, 225 (1971).
19. VRANSKY, V. K.: Surface electric properties of cellular membranes. In: *Biophysics of membrane transport* (Ed: J. Gomulkiewicz, B. Tomicki) **2**, 240 (1975).
20. WOOD, P. F.: COOPER, The application of gel filtration to the study of protein-binding of small molecules. *Chromatog. Rev.* **12**, 88 (1970).