

Белок и соль: пространственно-временные события в высыхающей капле

© Т.А. Яхно, В.Г. Яхно, А.Г. Санин, О.А. Санина, А.С. Пелюшенко

Институт прикладной физики РАН,
603950 Нижний Новгород, Россия
e-mail: tanya@awp.nnov.ru; yakhno@appl.sci-nnov.ru

(Поступило в Редакцию 12 января 2004 г.)

Проведено исследование процессов самоорганизации в высыхающих каплях биологических жидкостей и водных растворов, содержащих белок и соль в разных соотношениях, на твердой подложке. С помощью морфологических и гистохимических методов показано, что фазовый переход солей происходит в недрах предварительно сформированной гелеобразной органической матрицы, физические свойства которой влияют на морфологические особенности формирующихся солевых паттернов и кинетику процесса кристаллизации соли. Показано также, что дозированное повреждение белка в составе белково-солевых растворов с помощью УФ облучения нарушает формирование регулярного геля и вносит элементы хаоса в образование солевых паттернов. Разработан новый методический подход для исследования процесса самоорганизации путем регистрации изменения акустомеханического импеданса в высыхающих каплях. Высказано мнение, что динамические параметры кристаллизации солей в высыхающих каплях несут информацию о составе жидкости в целом.

Введение

Интерес исследователей к процессам, происходящим в высыхающих каплях жидкостей, в последнее десятилетие значительно возрос [1–5]. С одной стороны, он определяется потребностью в улучшении технологий, связанных с этими процессами, например в нанесении лакокрасочных покрытий на различные поверхности, производстве струйных принтеров и улучшении методов прогнозирования атмосферных явлений. С другой стороны, высыхающая капля привлекает внимание физиков как естественная модель самоорганизующейся системы с богатым набором вариаций течения процесса, определяемых ее составом, свойствами подложки и внешними условиями [6–8]. Характер паттернообразования в высохших каплях биологических жидкостей используется также как вспомогательный критерий при медицинской диагностике [9]. Понимание закономерностей развития пространственно-временных событий в высыхающих каплях важно для выбора интегральных критериев их оценки и создания новых инструментальных методов для их регистрации.

В настоящей работе мы хотели бы обратить внимание на последовательность фазовых переходов, происходящих в высыхающих каплях биологических жидкостей и модельных белково-солевых растворов. Полученные данные проливают свет на некоторые причинно-следственные связи между характером кристаллизации соли и составом исследуемой жидкости.

Материалы и методы

Предметом изучения служили биологические жидкости: слюна, моча и сыворотка крови здоровых доноров (10 человек), сыворотка крови и слюна больных

разными формами заболеваний печени (10 человек). Каждую пробу по 6–8 капель объемом $5\ \mu\text{l}$ помещали на отдельном стекле, после чего пробы высушивали при комнатной температуре в течение суток. Часть экспериментального материала в виде капель на стекле высушивали под микроскопом „МБС-10“ с телевизионной камерой, сопряженной с компьютером. С помощью программы „Fly Video“ регистрировали процесс структуризации капель. Оцифрованные изображения записывали в память компьютера каждую минуту.

Высушенные на стекле капли сыворотки крови фиксировали 10 min в метаноле при температуре $+4^\circ\text{C}$, после чего окрашивали альциановым синим для выявления гликозаминогликанов и кислых мукополисахаридов и реактивом Шиффа — йодной кислотой (ШИК реакция) для выявления гликопротеинов [10]. Окрашенные капли исследовали под микроскопом „Люмам-ИЗ“.

В отдельной серии экспериментов капли сыворотки крови объемом $5\ \mu\text{l}$ (40 капель) последовательно наносили на предметные стекла через каждую минуту. Через минуту после нанесения последней капли поверхность стекол одновременно „промокали“ наложением одного слоя стерильного бинта. В результате жидкая часть капель впитывалась в бинт и появлялась возможность следить за поэтапным развитием событий на границе капля–подложка.

Исследовали характер кристаллизации NaCl в высыхающих каплях раствора белка карбоангидразы в физиологическом растворе (1 mg/ml) до и после воздействия на раствор излучения ХеСl лазера ($\lambda = 308\ \text{nm}$) [11]. Степень фотоповреждения белка контролировали методом аналитической жидкостной хроматографии (FPLC, Pharmacia Biotech). Исследовали также влияние концентрации белка на динамические параметры кристаллизации соли. Для этого использовали 7-, 8- и 9%-ные

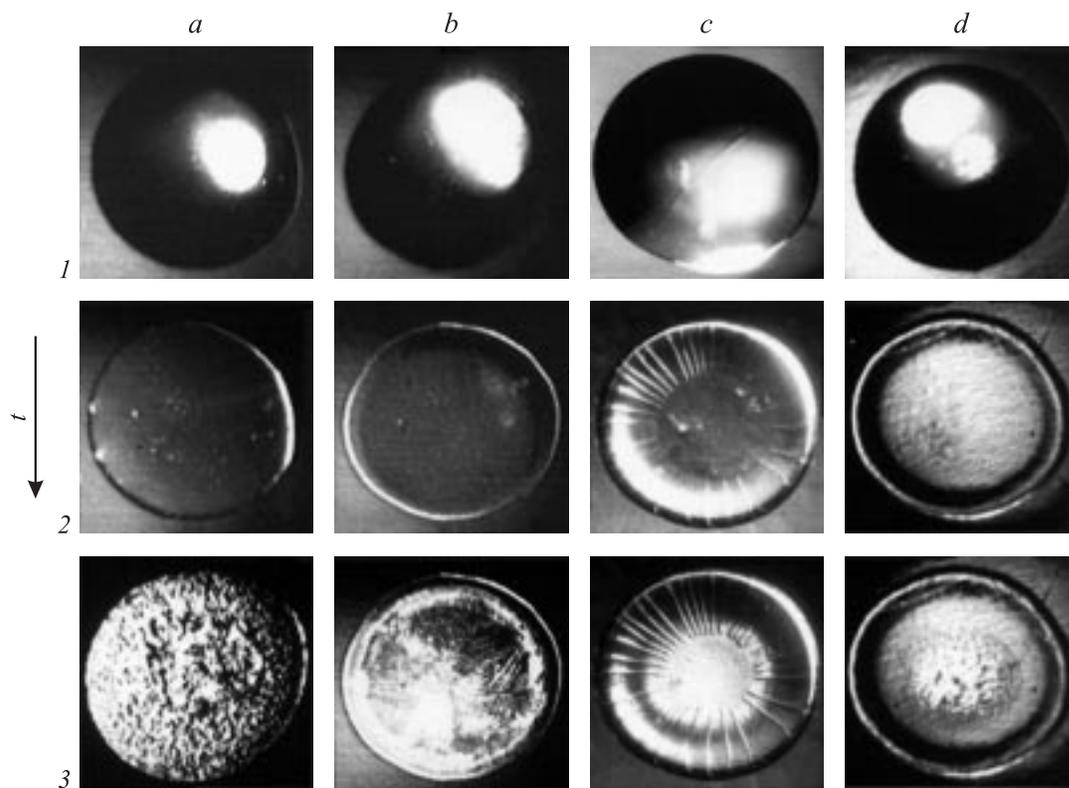


Рис. 1. Последовательность фазовых переходов в процессе высыхания капель биологических жидкостей. *a* — моча, *b* — слюна, *c* — сыворотка крови здорового донора, *d* — сыворотка крови больного гепатитом. 1 — начало высыхания, 2 — образование гелевой матрицы, 3 — фазовый переход солей (ув. $\times 5$).

(по весу) растворы сухого лиофилизированного бычьего альбумина в физиологическом растворе NaCl.

Динамические параметры фазовых переходов в высыхающих каплях исследовали методом регистрации акустомеханического импеданса (АМИ) при помощи программно-аппаратного комплекса, описанного нами ранее [12]. Принцип его работы состоит в следующем. В капле жидкости ($5 \mu\text{l}$), высыхающей на поверхности кварцевого резонатора, колеблющегося с постоянной частотой, равной резонансной частоте ненагруженного резонатора (60 КHz), возникает сдвиговая волна, чрезвычайно чувствительная к возникновению и росту новой фазы на границе жидкость–кварц. Прибор регистрирует изменение комплексной электрической проводимости системы капля–кварц, по которой рассчитывается динамика АМИ высыхающей капли. Процесс отображается на экране монитора в режиме реального времени.

Результаты и их обсуждение

Ранее мы отметили, что первая фаза высыхания каплей биологических жидкостей сопровождается уплощением их купола [12,13]. Механизм, заставляющий каплю уплощаться при испарении, связан с фактом ее прикрепления к подложке на границе раздела трех

фаз [7,14]. Уплотнение купола высыхающей капли индуцирует в ней центробежные течения, которые выносят содержащиеся в капле частицы твердой фазы на периферию [7,8]. Общим явлением для капель исследованных нами биологических жидкостей является то, что в ходе конденсации растворов сначала в них образуется ограниченная гелеподобная матрица, а затем происходит фазовый переход солей (рис. 1). Таким образом, кинетика процесса кристаллизации соли может нести информацию об особенностях структуры геля, а следовательно, и о жидкости в целом. Для проверки этого предположения в первой серии экспериментов мы исследовали зависимость кинетики фазового перехода солей от концентрации белка.

На рис. 2 показаны кривые АМИ, отражающие динамику структуризации высыхающих капель 7-, 8- и 9%-ных растворов альбумина в физиологическом солевом растворе (0.9% NaCl). Каждая кривая условно делится нами на 5 участков в соответствии с разными стадиями процесса. Рассмотрим эти стадии на примере кривой 3 (рис. 2). В начале высыхания происходит прикрепление капли к субстрату, сопровождающееся ее уплощением и образованием белкового ринга (рис. 2, кривая *ab*). Участок кривой *bc* соответствует формированию геля, а кривой *cd* — консолидированному фазовому переходу соли. За кристаллизацией соли следует

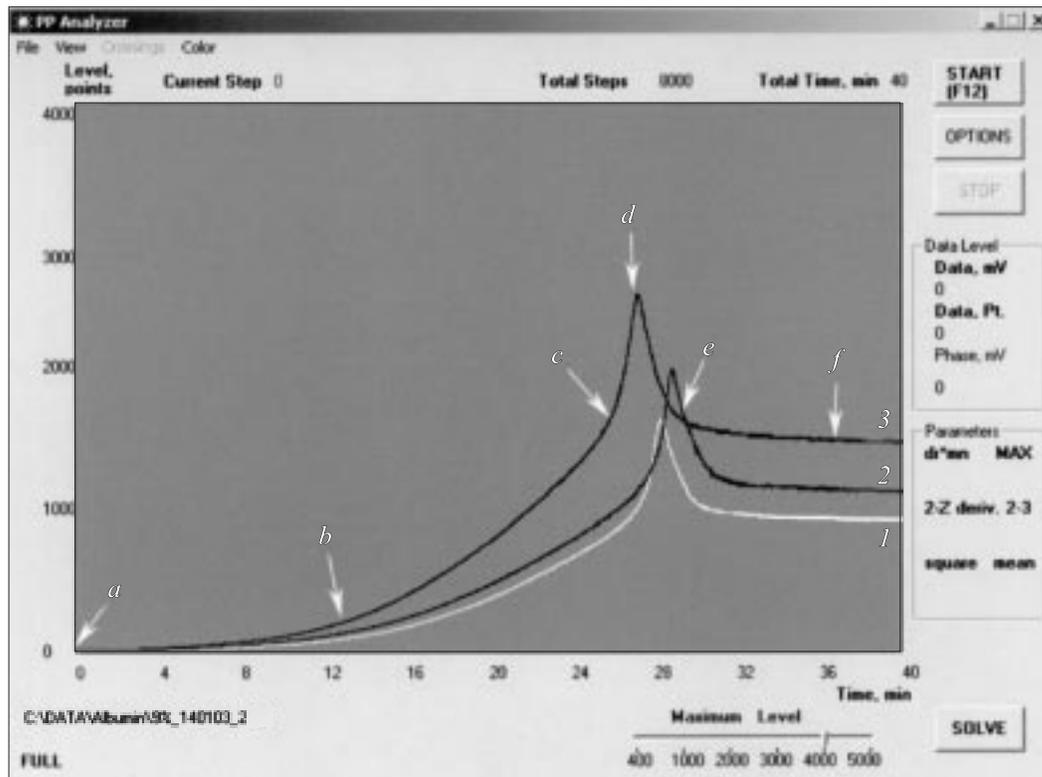


Рис. 2. Интерфейс программы отображения динамики АМИ в процессе высыхания капель раствора альбумина разных концентраций в 0.9% NaCl (физиологическом растворе): 1 — 7, 2 — 0.8, 3 — 9%. Ось Y — АМИ (усл. ед.), ось X — время (min). a – f — границы разных стадий процесса.

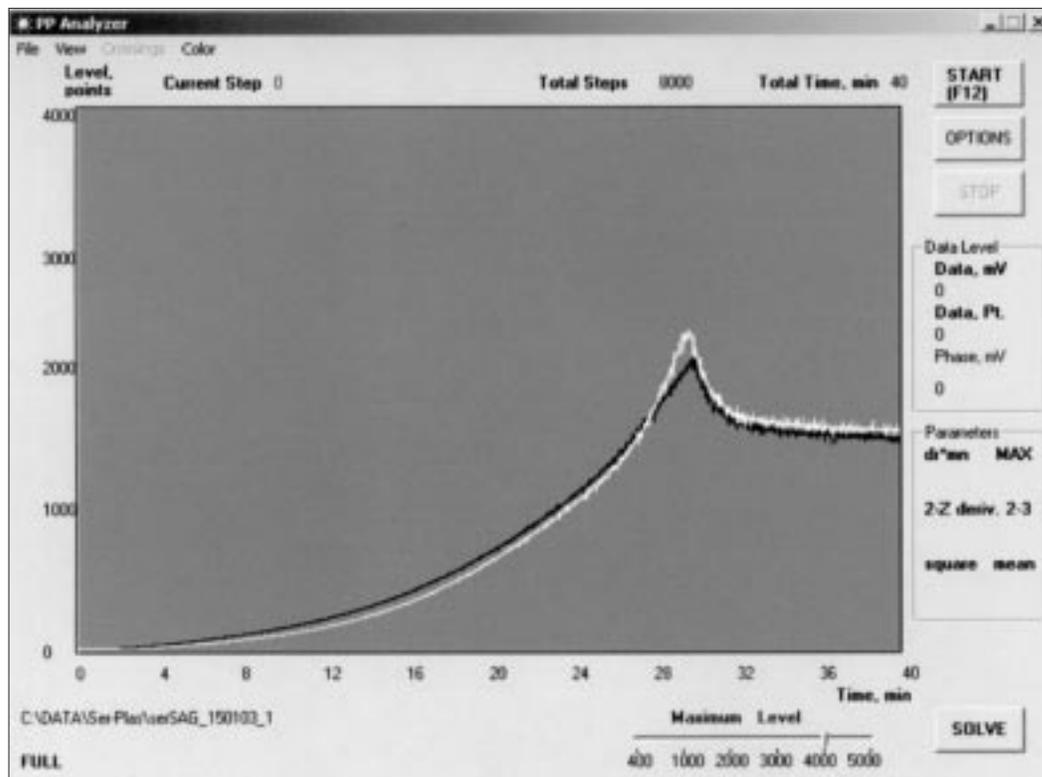


Рис. 3. Интерфейс программы отображения динамики АМИ в процессе высыхания капель плазмы (черная кривая) и сыворотки (белая кривая), приготовленных из одного и того же образца донорской крови. Ось Y — АМИ (усл. ед.), ось X — время (min).

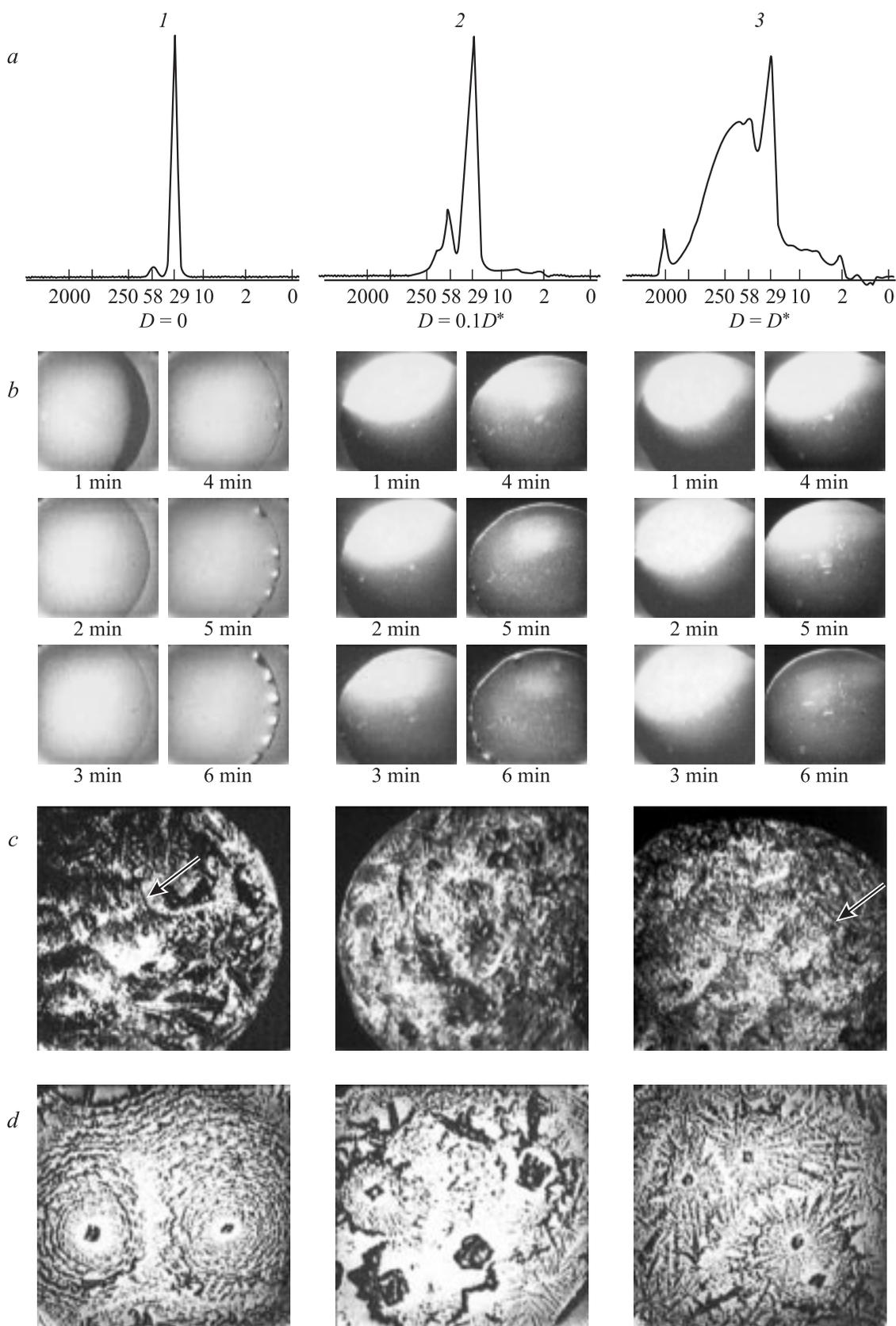


Рис. 4. Структуризация высыхающих капель раствора карбоангидразы в физиологическом растворе (0.5 mg/1 ml) до и после УФ облучения в разных дозах. 1 — до облучения, 2 — после облучения в дозе 20 J/m^2 , 3 — после облучения в дозе 200 J/m^2 . *a* — молекулярно-массовое распределение, *b* — первые шесть минут высыхания, *c* — рельеф высохших капель (ув. $\times 140$). Стрелками указана зона солевых паттернов в высохшей капле.

испарение остатков свободной воды (*de*). Участок *ef* характеризует массу высохшей капли с рыхло связанной и иммобилизованной водой. Видно, что динамика АМИ (рис. 2) позволяет выявлять как разные стадии процесса структуризации, так и то, что в растворах с разной концентрацией белка описанные выше процессы протекают по-разному. Наблюдаемые различия могут быть связаны с разной плотностью образующегося геля: с ростом концентрации белка в растворе испарение воды на заключительном этапе высыхания капли (*cd*) происходит медленнее, и это лимитирует скорость процесса кристаллизации соли.

Аналогичные результаты были получены при сравнении динамических параметров структуризации в высыхающих каплях плазмы и сыворотки,¹ приготовленных из крови одного и того же донора. Удаление части белка из жидкой части крови приводило к ускорению процесса фазового перехода солей (рис. 3).

Следующая серия экспериментов была посвящена исследованию зависимости кинетики структурообразования в высыхающих каплях белково-солевых растворов от степени фотоповреждения белка.² Использовали раствор белка карбоангидразы в физиологическом растворе (0.5 mg/1 ml). В интактном растворе белок присутствовал в виде мономеров (рис. 4, *a*). Облучение ХеСI лазером в дозе 20 J/m² приводило к появлению фракции димеров и „осколков“ молекул. При увеличении дозы облучения в 10 раз белок в основном был представлен ди-, три- и полимерными образованиями, а также значительной „осколочной“ фракцией.

Состояние белка в растворе отражалось на светорассеивающей способности капель уже в первые минуты высыхания (рис. 4, *b*). Капли необлученного раствора сохраняли гомогенную структуру до момента кристаллизации соли. Рельеф высохших капель позволял различить центральную зону солевых паттернов (рис. 4, *c*), каждый из которых представлял собой кристалл соли (NaCl) правильного строения, окруженный концентрическими фестончатыми структурами (рис. 4, *d*).

Облучение раствора дозой 20 J/m² приводило к быстрому увеличению светорассеяния высыхающих капель вследствие агрегации белка и сопровождалось образованием грубодисперсной белковой матрицы с примесью белковых агрегатов (рис. 4, *b*). Центральная зона высохших капель выглядела неупорядоченной (рис. 4, *c*) и состояла в основном из крупных кристаллов соли искаженной формы и редких паттернов с признаками нарушения симметрии (рис. 4, *d*).

После облучения дозой 200 J/m² агрегация поврежденного белка нарастала так стремительно, что массивные агрегаты в течение первой минуты оседали на подложку и не принимали активного участия в дальнейших событиях. В результате содержание белка

в жидкой части капли становилось значительно ниже, чем в исходном растворе. По-видимому, оставшийся в растворе белок в процессе высыхания капли формировал более однородную среду, чем после облучения раствора в меньшей дозе, благодаря чему на рельефе высохших капель вновь четко выделялась центральная зона, состоящая из солевых паттернов. В этом случае паттерны тоже представляли собой центрально-симметричные фигуры, но иной формы, чем в необлученном растворе: каждый паттерн содержал кристалл соли, окруженный радиально направленными стреловидными структурами (рис. 4, *d*).

Рис. 5 отражает рассмотренные выше особенности динамики процесса структуризации высыхающих капель данных растворов. Ускорение процессов агрегации белка и осаждения его на поверхность кварца после облучения иллюстрирует дозозависимый сдвиг восходящей части кривых влево. Хаотическая структуризация капель после облучения дозой до 20 J/m² сопровождается более высоким подъемом кривой, что может быть связано с большей массой иммобилизованной в высыхающем геле воды. Уширение пика кривой АМИ и появление вторичных пиков на его вершине в высыхающей капле раствора после облучения дозой 200 J/m² свидетельствует о нарушении консолидации (пространственно-временной синхронизации) процесса кристаллизации соли.

Таким образом, степень повреждения белка влияет на кинетические параметры кристаллизации соли в белково-солевых растворах. Регистрация АМИ в высыхающих каплях этих растворов достоверно отражает физико-химические особенности их структуризации, связанные не только с концентрацией, но и с качественным состоянием белка.

Более сложные события происходят в высыхающих каплях плазмы и сыворотки крови. Первым из известных нам описаний динамики структуризации высыха-

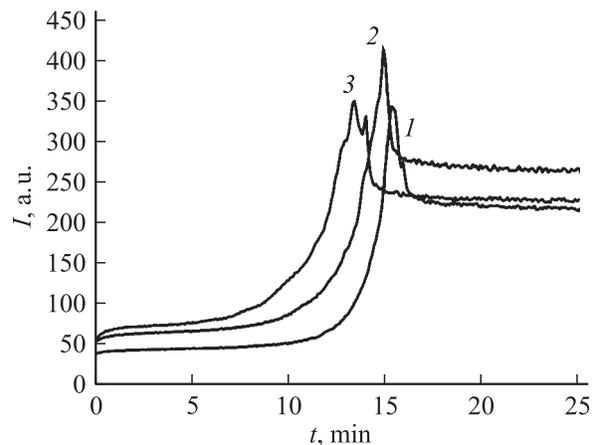


Рис. 5. Динамика АМИ высыхающих капель раствора карбоангидразы в физиологическом растворе (0.5 mg/1 ml) до и после УФ облучения в разных дозах. 1 — до облучения, 2 — после облучения в дозе 20 J/m², 3 — после облучения в дозе 200 J/m².

¹ Сыворотка крови отличается от плазмы отсутствием белка фибриногена, содержание которого в плазме составляет ~ 4–5%.

² Материал был получен в совместной работе [11].

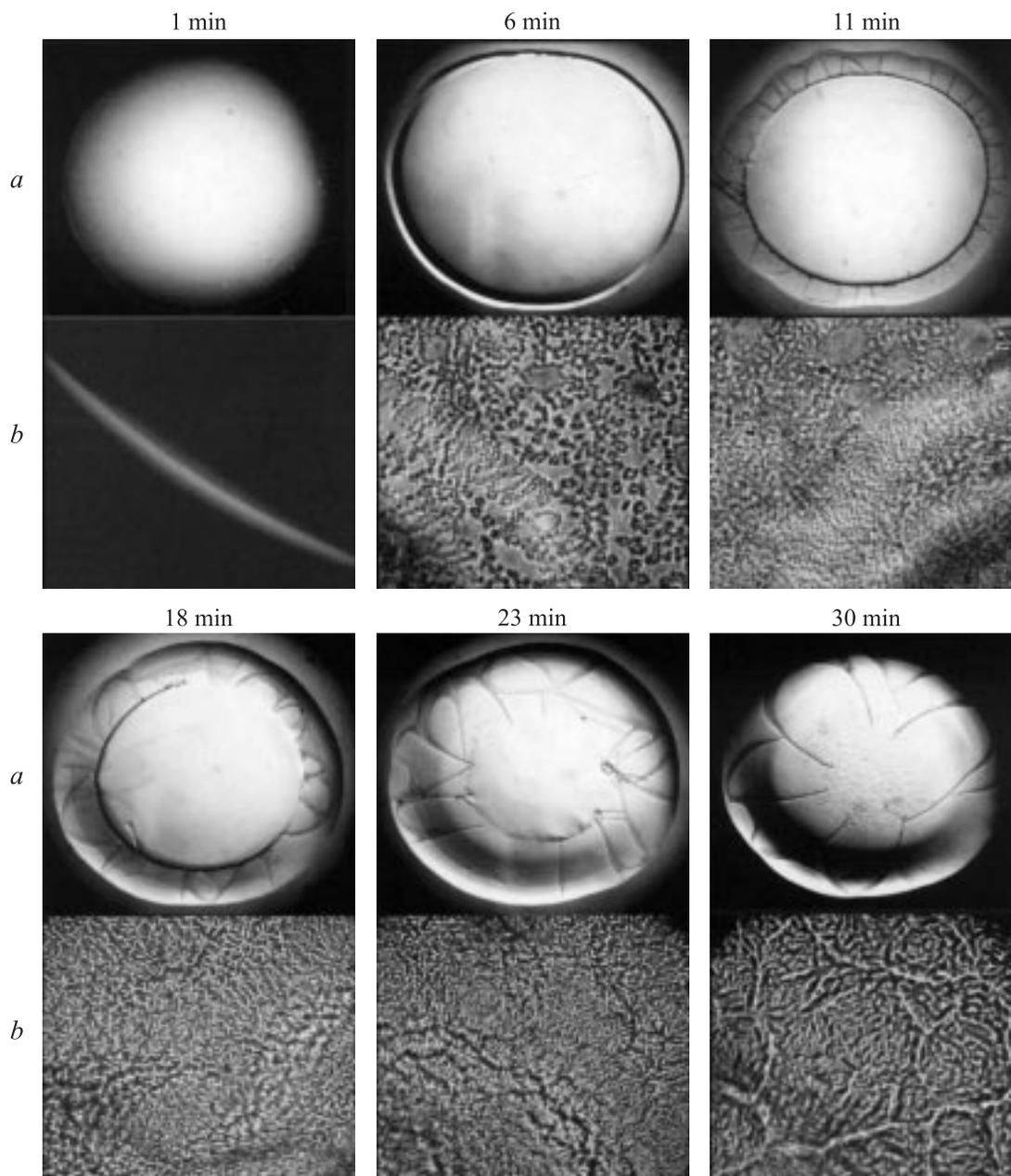


Рис. 6. Этапы формирования структур в высыхающих каплях сыворотки крови на границе жидкость–подложка. Снимки сделаны после удаления жидкой фазы через разные промежутки времени с начала высыхания. *a* — внешний вид твердой фазы каплей (ув. $\times 5$), *b* — поэтапное образование геля (ув. $\times 140$).

ющих каплей белков является работа [15]. Наблюдая за высыхающими каплями различных белков (в том числе и сыворотки крови) под световым микроскопом, автор описала последовательность закономерного формирования структур: образование колец по периферии капли, появление радиальных аркообразных трещин, формирование центра, где кольца отсутствовали. Для высохших каплей разных белковых растворов характерной структурой являлась „розетка“, образованная радиальным растрескиванием, и блоки, напоминающие „клетки с ядрами“, образованные поперечным растрес-

киванием. Наблюдаемые явления автор впервые связала с процессами самоорганизации, происходящими в белке, находящемся в неравновесных условиях.

Эти исследования были продолжены авторами [9], собравшими большой фактический материал по структуризации каплей биологических жидкостей человека в приложении к медицинской диагностике. Авторами также дано морфологическое описание процессов, происходящих при высыхании капли сыворотки крови, приведены результаты исследования зависимости морфологических особенностей солевых и белковых структур от

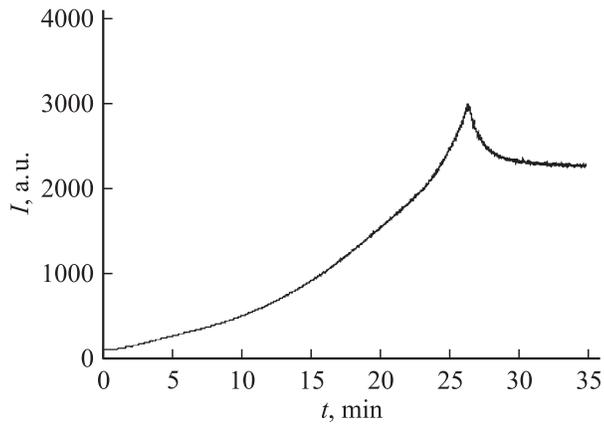


Рис. 7. Динамика АМИ высыхающей капли сыворотки крови, использованной в эксперименте, представленном на рис. 6.

концентрации белка и соли в биологических жидкостях. Наши наблюдения совпадают с наблюдениями авторов в отношении последовательности морфологических картин в высыхающих каплях сыворотки крови, наблюдаемых в оптический микроскоп. Но некоторые данные литературы и собственные исследования позволили нам интерпретировать процесс с несколько иных позиций.

Мы проследили последовательность структуропостроения в высыхающих каплях сыворотки крови через принудительную остановку процесса путем удаления

жидкой части высыхающих капель через разные промежутки времени от начала высыхания. Результаты, представленные на рис. 6, дают представления о развитии процесса на границе жидкость–подложка. Динамика структуризации высыхающей капли сыворотки, использованной для данного эксперимента, приведена на рис. 7.

Уже через минуту после помещения капли на стекло был замечен твердый ободок, формирующий линию прикрепления капли к подложке. Как оказалось, это явление наблюдается также в суспензиях микросфер полистирола в деонизированной воде и связано с центробежными гидродинамическими течениями, закономерно возникающими в высыхающей капле [7]. Поэтому нам представляется обоснованным утверждение, что определенное участие в этом процессе принимает агрегация белка, заметная по прогрессирующему нарастанию светорассеяния. Часть агрегатов выносятся на периферию капли, формируя линию прикрепления, другая часть оседает на подложку и принимает участие в построении геля по мере конденсации материала капли (рис. 6), т. е. продвижение фронта структуризации жидкой части капли происходит одновременно с формированием слоя геля на границе капля–подложка и жидкая часть капли „продвигается“ по поверхности образующегося геля, оставляя за собой концентрические круги (рис. 8, *a*). Природа подобного продвижения фронта в высыхающей капле описана в работе [14]. Она связана с периодическим скачкообразным возвращением

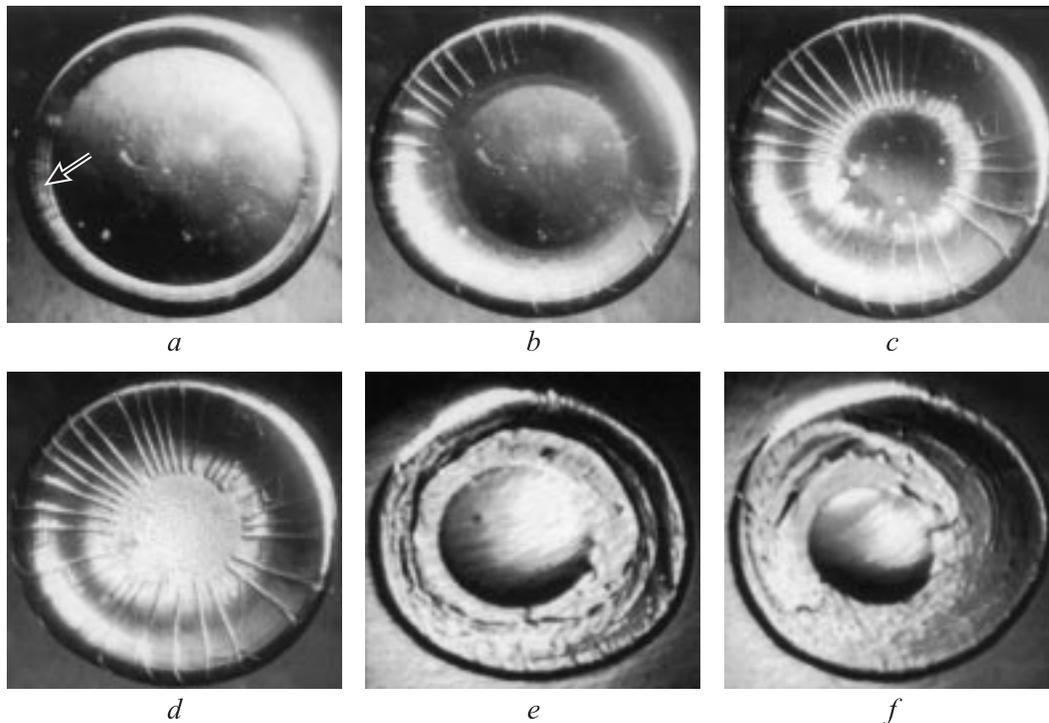


Рис. 8. Продвижение фронта структуризации в высыхающих каплях сыворотки крови здорового донора (*a–d* — начало кристаллизации солей). Жидкая фаза на поверхности плотного геля в высыхающих каплях сыворотки крови больных хроническими заболеваниями печени (*e, f*). Стрелкой указаны следы продвижения фронта.

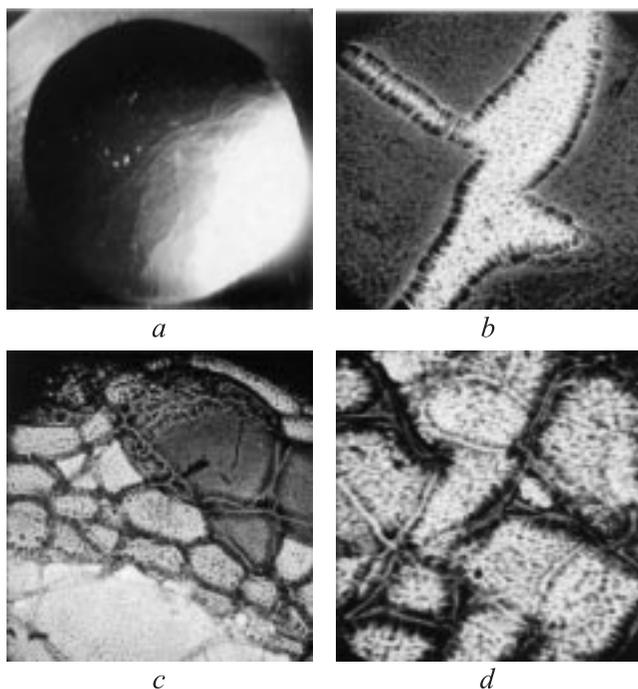


Рис. 9. Образование „жгутов“ на поверхности жидкой капли сыворотки крови (*a*, ув. $\times 10$) и многоуровневая сеть волокон, выявляемая в высохшей капле сыворотки крови после процедуры фиксации и окраски: *b* — треснувшая поверхность капли, *c* — периферическая зона капли, *d* — центральная зона капли (ув. $\times 140$).

капли к наиболее равновесной форме, а именно с уменьшением соотношения между площадью поверхности и объемом. По мере продвижения краев капли к центру соотношение в ней белка и солей меняется в сторону солей. Известно [16,17], что соли оказывают сильное влияние на процесс гелеобразования в растворе, меняя как структуру раствора, так и поверхностные свойства полимера. В работе [18] показано, что повышение концентрации соли в белково-солевых растворах угнетает гелеобразование. Возможно, поэтому высохшая капля сыворотки (плазмы) крови обычно имеет вогнутую форму. Повышение концентрации солей сопровождается уменьшением коэффициента диффузии воды через гель [19]. Поэтому фронт кристаллизации соли распространяется от периферии к центру (рис. 8, *c, d*). Если гель рыхлый, то он не в состоянии удержать на своей поверхности каплю [20] и продвижение фронта структуризации в недрах геля трудно различить в оптический микроскоп (рис. 1, *d*). В некоторых случаях можно наблюдать образование и отщепление плотного геля, на гидрофобной поверхности которого высыхают остатки жидкой фазы сыворотки (рис. 8, *e, f*).

Таким образом, гелеобразование в высыхающей капле сыворотки (плазмы) крови предшествует фазовому переходу солей. Некоторые аспекты этого процесса рассмотрены нами ранее [21]. Кооперативность идущих

процессов структуризации капель находит отражение в динамических параметра АМИ.

До сих пор главное внимание было уделено событиям, происходящим на границе капля–подложка, но не менее интересные превращения иногда можно наблюдать и на границе капля–воздух. Впервые это явление было описано в работе [9], но неоднократно наблюдалось и нами. В первые минуты высыхания капли сыворотки крови в поверхностном адсорбционном слое возникают квазидиаметрально расположенные жгуты, способные к перемещению в пределах приповерхностного слоя (рис. 9, *a*), а затем исчезающие из поля зрения. Мы расцениваем это как визуализацию процессов полимеризации макромолекул и начало организации „каркаса“ капли сверху. В данном процессе могут принимать участие такие макромолекулы как гликопротеиды, гликолипиды и гликозаминогликаны. Действительно, после гистохимической окраски высохших капель можно убедиться, что их белковый остов представляет собой многоуровневую сеть (рис. 9, *b-d*). При данном способе обработки солевые компоненты вымываются, но картина наглядно демонстрирует, что параметры каркаса способны влиять на кинетику испарения воды, а следовательно, и процесса кристаллизации солей.

Мы далеки от мысли, что полностью расшифровали столь богатый событиями процесс, как самоорганизация высыхающих капель жидкостей сложного состава. Понадобятся годы и усилия многих исследователей, чтобы шаг за шагом постигать подробности этого феномена. Тем не менее мы хотели бы обозначить некоторые ключевые положения, основанные на известных физических явлениях и результатах собственных наблюдений.

Заключение

Капля жидкости на твердой подложке принимает равновесную форму, т. е. форму с наименьшей площадью поверхности при данном объеме и степени смачивания подложки. Процесс самоорганизации в высыхающих каплях белково-солевых растворов начинается с формирования адсорбционных слоев белка на границах раздела фаз. Конденсация материала капли стимулирует процессы агрегации белков и полимеризации макромолекул, давая начало формированию многоуровневого гелевого каркаса. Образование ободка твердой фазы по периферии капли формирует линию прикрепления и вынуждает каплю становиться более плоской, т. е. удаляться от равновесной формы.

Если энергия поверхности превысит силы адгезии на границе раздела трех фаз, то капля скачкообразно уменьшит свой диаметр и вновь примет равновесную форму. Этот процесс может повторяться. При этом на твердой фазе остаются концентрические круги, отмечая бывшие линии прикрепления капли. По мере продвижения фронта жидкой капли к центру масса ее уменьшается, а концентрация солей растет.

Если плотность геля мала, то остатки жидкой фазы не образуют каплю на его поверхности и процесс „досыхания“ происходит внутри геля.

На заключительном этапе высыхания капли происходит фазовый переход солей. Специфику этого этапа определяет наличие сформировавшегося геля. Поэтому кинетика испарения воды во время фазового перехода солей определяется физическими свойствами геля, зависящими от концентрации и качества макромолекул, а также от концентрации низкомолекулярных ограниченных компонентов раствора. Иными словами, кинетика заключительного этапа высыхания капли (фазового перехода солей) содержит интегральную информацию о составе и качестве жидкости в целом.

Динамика АМИ высыхающей капли отражает стадии процесса структуризации и может быть использована для их оценки.

Авторы благодарны сотрудникам лечебных и исследовательских учреждений Нижнего Новгорода за предоставление образцов сыворотки и плазмы крови. Особую благодарность адресуем П.П. Потехину за консультационную помощь в проведении гистохимической окраски образцов, В.В. Немову за исследование образцов методом жидкостной хроматографии, а также Л.В. Соустову и Е.В. Челнокову за проведение экспериментов с ХеСl лазером.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (гранты № 01-01-00388 и 02-04-49342), а также INTAS (грант N 01-06-90) и CRDF (N RMO-10214-BNL, 36943).

Список литературы

- [1] *Khaidarov G.G.* // Zh. Fiz. Khim. 1983. Vol. 57. N 10. P. 2528–2530.
- [2] *Monchick L.* // J. Chem. Phys. 1984. Vol. 81. N 4. P. 2010–2015.
- [3] *Birdi K.S., Vu D.T., Winter A.* // J. Phys. Chem. 1989. Vol. 93. N 9. P. 3702–3703.
- [4] *Erbil H. Yildirim* // J. Phys. Chem. B. 1998. Vol. 102. N 46. P. 9234–9238.
- [5] *Clint J.H., Fletcher P.D.I., Todorov I.T.* // Phys. Chem. Chem. Phys. 1999. Vol. 1. N 21. P. 5005–5010.
- [6] *Deegan R.D.* // Phys. Rev. E. 2000. Vol. 61. N 1. P. 475–485.
- [7] *Deegan R.D., Bakajin O., Dupont T.F. et al.* // Phys. Rev. E. 2000. Vol. 62. N 1. P. 756–765.
- [8] *Rauchard L., Parisse F., Allain C.* // Phys. Rev. E. 1999. Vol. 59. N 3. P. 3737–3740.
- [9] *Шабалин В.Н., Шатохина С.Н.* Морфология биологических жидкостей человека. М.: Хризостом, 2001. 300 с.
- [10] Микроскопическая техника. Руководство для врачей и лаборантов / Под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Петрова. М.: Медицина, 1996. С. 76–77, 80–81.
- [11] *Соустов Л.В., Челноков Е.В., Битюрин Н.М.* и др. // Препринт ИПФ РАН. № 599. Н. Новгород, 2002. 19 с.
- [12] *Яхно Т.А., Яхно В.Г., Санин А.Г., Шмелев И.И.* // Биофизика. 2002. Т. 47. Вып. 6. С. 1101–1105.

- [13] *Яхно Т.А., Яхно В.Г., Левин Г.Я.* и др. // Материалы Четвертой Междунар. конф. по математическому моделированию. М.: МГТУ „Станкин“, 2001. Т. 2. С. 265–275.
- [14] *Гегузин Я.Е.* // Капля. М.: Наука, 1973. С. 54–56.
- [15] *Rapuc E.G.* // Письма в ЖТФ. 1988. Т. 14. Вып. 17. С. 1561–1565.
- [16] *Chiotelli E., Pilosio G., Le Meste M.* // Biopolymers. 2002. Vol. 63. Issue 1. P. 41–58.
- [17] *Kesselman E., Ramon O., Berkovich R., Paz Y.* // Polymers for Advanced Technologies. 2002. Vol. 13. Issue 10–12. P. 982–991.
- [18] *Palacios A.C., Sarnthein-Graf C., La Mesa C.* // Colloids and Surfaces A. 2003. Vol. 228. P. 25–35.
- [19] *Anderson B.C., Cox S.M., Ambardekar A.V., Mallapragada S.K.* // J. Pharmaceutical Sciences. 2000. Vol. 91. Issue 1. P. 180–188.
- [20] *Измайлов В.Н., Ямпольская Г.П., Сумм Б.Д.* // Поверхностные явления в белковых системах. М.: Химия, 1988. 239 с.
- [21] *Яхно Т.А., Седова О.А., Санин А.Г., Пелюшенко А.С.* // ЖТФ. 2003. Т. 73. Вып. 4. С. 23–27.