УДК 616.832–004.2–577.125.8

ДІЯ ВІТАМІНУ D_3 НА РОЗВИТОК ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ ТА ЛІПІДНОГО ДИСБАЛАНСУ В ТКАНИНІ МОЗКУ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АУТОІМУННОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ

Е. П. Пасічна, Г. В. Донченко, Р. П. Морозова

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України

Вивчали дію вітаміну D_3 за різних умов його введення (в фізіологічній дозі у складі вітамінної суміші та окремо у підвищеній дозі в межах UL) на розвиток оксидативного стресу та порушень ліпідного метаболізму, а саме вміст вільних SH-груп, ТБК-активних продуктів, активність глутатіонпероксидази і каталази у мозку, а також вміст холестеролу, сфінгомієліну, цераміду та вільного сфінгозину у мозку та клітинах глії щурів за умов ЕАЕ. Виявлено, що застосування підвищеної дози вітаміну D_3 окремо, на відміну від його фізіологічної дози у складі вітамінної суміші, призводило до збільшення вмісту вільних SH-груп у мозку хворих тварин за наявності симптомів, позитивно впливало на стан пероксидного окислення ліпідів у мозку (вміст ТБК-активних продуктів достовірно знижувався) і антиоксидантної системи, а також сприяло достовірному зниженню за умов ЕАЕ вмісту сфінгозину та молярного співвідношення холестерол/сфінгомієлін у тканині мозку, а також цераміду у гліальній клітинній фракції мозку. Отримані дані можуть свідчити про регуляторну дію вітаміну D_3 на вміст глутатіону, обмін сфінгомієліну, активність перекисних та антиоксидантних процесів у мозку за умов ЕАЕ.

Ключові слова: РОЗСІЯНИЙ СКЛЕРОЗ, ОКСИДАТИВНИЙ СТРЕС, НЕЙРОГЛІЯ, АПОПТОЗ, ЛІПІДИ, ХОЛЕСТЕРОЛ, СФІНГОМІЄЛІН, ЦЕРАМІДИ, СФІНГОЗИН, ОБМІН СФІНГОЛІПІДІВ, ВІТАМІН $Д_3$

Формування мієлінової оболонки в організмі людини і вищих тварин, як відомо, відбувається у ранньому постембріональному періоді і є одним із відповідальних етапів розвитку його нервової системи. Цей процес забезпечується клітинами глії, які синтезують білкові й ліпідні складові мієліну. За умов нормального функціонування клітин між ними в мембранах підтримується певний баланс, що має значення не тільки в забезпеченні нормальної структури мієліну, а й в регуляції розвитку й функціонування нервової тканини. Особливо це стосується холестеролу (Х) і сфінгомієліну (СМ), що мають найбільшу взаємну спорідненість і можуть утворювати в мембрані латеральні домени (рафти), забезпечуючи мікроумови для функціонування мембранних білків [1]. Порушення механізмів регуляції метаболізму цих та інших мембранних компонентів у нервовій тканині можуть призводити до порушення процесів диференціації та взаємодії клітин, активації процесів деградації білків, ліпідів та ДНК, що може мати значення для ініціації механізмів клітинної загибелі та демієлінізації, як це відбувається за умов нейродегенеративних захворювань, і зокрема розсіяного склерозу (РС).

Відомо, що в мієлінових оболонках центральної та периферичної нервової системи вміст ліпідів складає біля 80 %, до того ж у їх складі підвищений вміст ліпідів з поліненасиченими жирними кислотами, зокрема арахідоновою, які легко окислюються вільними радикалами. Крім того, тканина мозку характеризується порівняно низькою активністю ферментів антиоксидантного захисту — каталази, СОД і ГП. Клітини мозку балансують на грані допустимого рівня вільних радикалів, оскільки останні виконують у них важливі регуляторні функції. Ці особливості пояснюють високу чутливість мозкової тканини для вільнорадикального ураження [2]. При порушенні балансу оксидативних та антиоксидантних механізмів відбувається накопичення АФО і продуктів ПОЛ, яке

супроводжує, а можливо, і викликає запальні, нейродегенеративні та інші зміни, призводячи до пошкодження й загибелі нервових клітин за умов РС.

РС вважається поліетіологічним запалювально-алергічним захворюванням, при якому вражається мієлінова оболонка нервових волокон за автоімунними механізмами, що завершується гліосклерозом [3]. Однак, незважаючи на численні дослідження, на жаль і досі немає чіткої уяви про механізми виникнення та розвитку цього захворювання.

Вважають, що вільні радикали відіграють важливу роль у патогенезі РС і їх часто називають медіаторами демієлінізації та аксональної дегенерації. Ці сполуки задіяні в механізмах розвитку багатьох симптомів цього захворювання, як, наприклад, хронічної втоми у хворих, тощо. Існує думка, що патологічне посилення процесів ПОЛ у нервовій тканині за умов РС ініціюється макрофагами та активованою мікроглією, які продукують вільнорадикальні сполуки під впливом прозапальних цитокінів, та завдяки активації глутаматних рецепторів, посилення синаптичного вивільнення і зниження внутрішньоклітинного захвату глутамату [4]. Таким чином, створюються умови для інтенсивного вільнорадикального ушкодження олігодендроцитів та мієлінових оболонок аксонів, наслідком чого є деградація мієліну та дегенерація аксонів. При цьому, як вважають, відбувається активація в олігодендроцитах сфінгомієліназ (СМ-аз) та церамід-залежна індукція апоптозу цього типу клітин.

Відомо, що терапія РС, яка в основному спрямована на модуляцію імунної системи, часто не має належного успіху [5]. Саме тому актуальною є розробка терапевтичних стратегій, спрямованих на антиоксидантний захист клітин [4, 6] та стабілізацію мембранних структур і сигнальних механізмів у клітинах нервової системи при цьому захворюванні .

В останні роки з'явилися дані про здатність вітаміну D_3 та його аналогів знижувати рівень токсичних метаболітів сфінгомієліну і попереджувати апоптоз деяких типів клітин in vitro [7]. При цьому встановлено, що $1,25(OH)_2D_3$, функціональний метаболіт вітаміну D_3, має здатність знижувати експресію індуцибельної NO-синтази та стимулювати — γ-глутамілтранспептидази в клітинах [8], справляючи антиоксидантну дію, а також регулювати проліферацію енцефалітогенних клітин (Th1-лімфоцитів), стимулювати продукцію Th2-клітинами протизапальних цитокінів IL-4 і TGF-β1, експресію NGF-β [9], знижувати внутрішньоклітинний рівень кальцію та попереджувати розвиток експериментального аутоімунного енцефаломієліту (ЕАЕ), що є моделлю РС [10]. Всі ці властивості вітаміну D_3 роблять його дуже перспективним для лікування як РС, так й інших аутоімунних захворювань.

Відносно нікотинаміду (НА) також відомо, що він захищає ДНК клітини від ушкодження вільними радикалами, знижуючи гіперпродукцію моноксиду нітрогену. До того ж він має здатність інгібувати експресію астроцитами факторів клітинної адгезії та антигенів головного комплексу гістосумісності II класу in vitro, а також підвищувати активність мікросомальних цитохром Р-450-залежних ферментів (монооксигеназ), що також важливо у лікуванні РС. Ще одною природною сполукою, яка виявляє потужні антиоксидантні та мембраностабілізуючі властивості, як відомо, є α-токоферол (вітамін Е). Не менш важливим за умов хвороби є й достатня забезпеченість організму вітамінами групи В, які підтримують енергетичний потенціал клітин нервової системи і забезпечують умови для антиоксидантного захисту клітин.

Всі ці біологічно активні сполуки кожна окремо та у їх поєднанні викликають велику зацікавленість у вивченні їх нейропротекторної дії за умов ЕАЕ та РС для розробки адекватних засобів попередження і лікування цієї патології та інших нейродегенеративних захворювань.

Метою нашої роботи було дослідити вплив вітаміну D^3 у суміші з вітамінами B^1, B^2, B^6, РР та Е та окремо у підвищеній дозі на розвиток оксидативного стресу і порушення метаболізму сфінгомієліну (СМ) у мозку щурів за умов ЕАЕ. Це дозволить наблизитися до з'ясування механізмів, які лежать в основі патологічного процесу, і підійти до методів корекції зазначених метаболічних порушень.

Для цього визначали вміст вільних SH-груп, ТБК-активних продуктів, активність глутатіонпероксидази і каталази у мозку, а також вміст холестеролу (Х), сфінгомієліну, цераміду та вільного сфінгозину (Сф) у мозку та клітинах глії щурів.

Матеріали і методи

У досліди брали по 5–6 щурів-самців масою 150–250 г лінії Wistar, яких розділяли на близькі за вагою групи. Тварин імунізували в подушечки задніх або передніх лап за допомогою суміші, що складалася із очищеного гомологічного мієліну і повного ад'юванта Фрейнда («Sigma»). Контролем були інтактні тварини, яким вводили відповідну кількість фізрозчину. Усі тварини знаходились на збалансованому раціоні віварію й одержували воду ad libitum. З 8-ої доби експерименту одна група імунізованих тварин отримувала перорально кожного дня протягом 13 діб вітамін D_3 у дозі 5мкг на кг ваги, друга — вітамінну суміш складу: тіаміну бромід, рибофлавін, піридоксин, НА, α-токоферол та вітамін D_3 у дозах, розрахованих із добової потреби організму щура у цих вітамінах. Дослідження проводили на 21 добу після інокуляції енцефалітогенної суміші, коли спостерігалися різної інтенсивності клінічні симптоми захворювання. Тяжкість симптомів характеризували за шкалою: 1 — зниження тонусу хвоста (парез); 2 — парез хвоста та однієї або двох задніх лап; 3 — параліч хвоста та парез задніх лап; 4 — параліч хвоста та задніх (або передніх) лап; 5 — параліч всіх кінцівок, агонія. Для умертвіння тварин використовували вуглекислий газ. Клітинні фракції нейроглії (олігодендроцити) отримували за методом Селлінджера у модифікації Флерова [11]. Ліпідні фракції тканин і клітин одержували за методом Фолча [12] і визначали в них вміст ліпідів гравіметричним способом, фосфоліпідів — за визначенням неорганічного фосфату й холестеролу загального і вільного, застосовуючи методи тонкошарової хроматографії [13]. Сфінгозин визначали за методом [14], цераміди — [15]. Стан пероксидації ліпідів і антиоксидантного захисту організму визначали у гомогенаті тканини мозку щурів за умов ЕАЕ. Вміст вільних SH-груп визначали за методом [16]. Дослідження активності ферментів проводилися за загальновідомими методиками. Активність глутатіонпероксидази (ГП) — спектрофотометрично за підвищенням вмісту окисленого глутатіону [17], каталази — за ступенем інгібування утворення пероксидних сполук молібдену в реакції з молібдатом натрію [18]. Інтенсивність процесів ПОЛ оцінювали за вмістом вторинних продуктів окислення ліпідів — тіобарбітуратпозитивних (ТБК-позитивних) продуктів на прикладі малонового діальдегіду (МДА) [19]. Білок визначали за Лоурі або його модифікації [20]. Всі досліди повторювали 2–3 рази. Результати обробляли за t-критерієм Ст'юдента.

Результати й обговорення

У результаті досліджень були виявлені неоднозначні зміни вмісту вільних SH-груп у тварин за умов ЕАЕ (рис. 1), а саме у тварин із симптомами захворювання, які оцінювалися за шкалою у 2 бали і вище було виявлено достовірне зниження їх вмісту (рис. 1 А), проте в тварин без симптомів та із легшим перебігом захворювання їх вміст підвищувався (рис. 1 Б). Застосування вітаміну D_3 призводило до достовірного збільшення вмісту вільних SH-груп у мозку хворих тварин за наявності симптомів і майже не впливало на їх вміст у тварин із легким перебігом захворювання. При цьому досліджувана суміш вітамінів не впливала на цей показник, як за наявності, так і за відсутності симптомів захворювання.

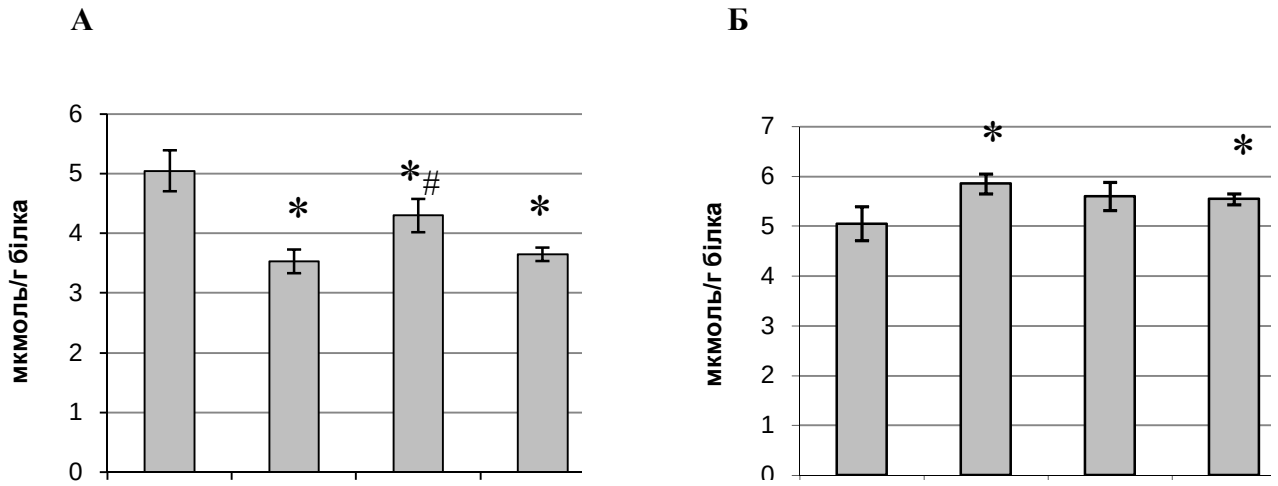


Рис. 1. Вміст вільних SH-груп у мозку щурів за умов ЕАЕ (M+m)

Примітка: А — тварини із симптомами захворювання 2–5 балів; Б — тварини із симптомами захворювання 0–1 бал
На осі абсцис: 1 — інтактні тварини; 2 — ЕАЕ 21-а доба після імунізації; 3 — ЕАЕ+D_3, 4 — ЕАЕ+вітамінна суміш
* — достовірні зміни відносно інтактних; # — достовірні зміни відносно хворих тварин без корекції

Відомо, що вільні SH-групи представлені в клітинах головним чином глутатіоном, одним з головних компонентів антиоксидантної системи. Очевидно, вплив вітаміну D_3 на вміст SH-груп у мозку відбувається завдяки здатності його підвищувати рівень глутатіону через активацію експресії γ-глутамілтранспептидази, одного з головних ферментів синтезу цього трипептиду. І хоча у вітамінному комплексі також присутній цей вітамін, доза його там значно менша, ніж застосована в окремому використанні вітаміну D_3, і явно недостатня для того, щоб активувати синтез глутатіону.

При цьому застосування як вітаміну D_3 у терапевтичній дозі (5 мкг на кг ваги), так і суміші вітамінів у фізіологічних дозах позитивно впливало на стан пероксидного окислення ліпідів у мозку. Як видно з рисунку 2 А, вміст ТБК-реагуючих продуктів у мозку щурів за умов ЕАЕ достовірно підвищувався, але як в першій, так і в другій групі тварин, які отримували вітаміни, був достовірно нижчим, ніж у хворих тварин без корекції, хоча і не досягав рівня інтактних тварин. З рисунку 2 Б видно, що застосування вітаміну D_3 окремо, незначно підвищувало активність глутатіонпероксидази, ключового ферменту антиоксидантного захисту, що належить до глутатіонової системи, при цьому її активність вже статистично не відрізнялася від цього ж показника в контрольній групі. Ці дані корелюють із вмістом вільних SH-груп у мозку. Вітамінна суміш при цьому суттєво не впливала на знижений за умов ЕАЕ рівень активності обох ферментів антиоксидантного захисту.

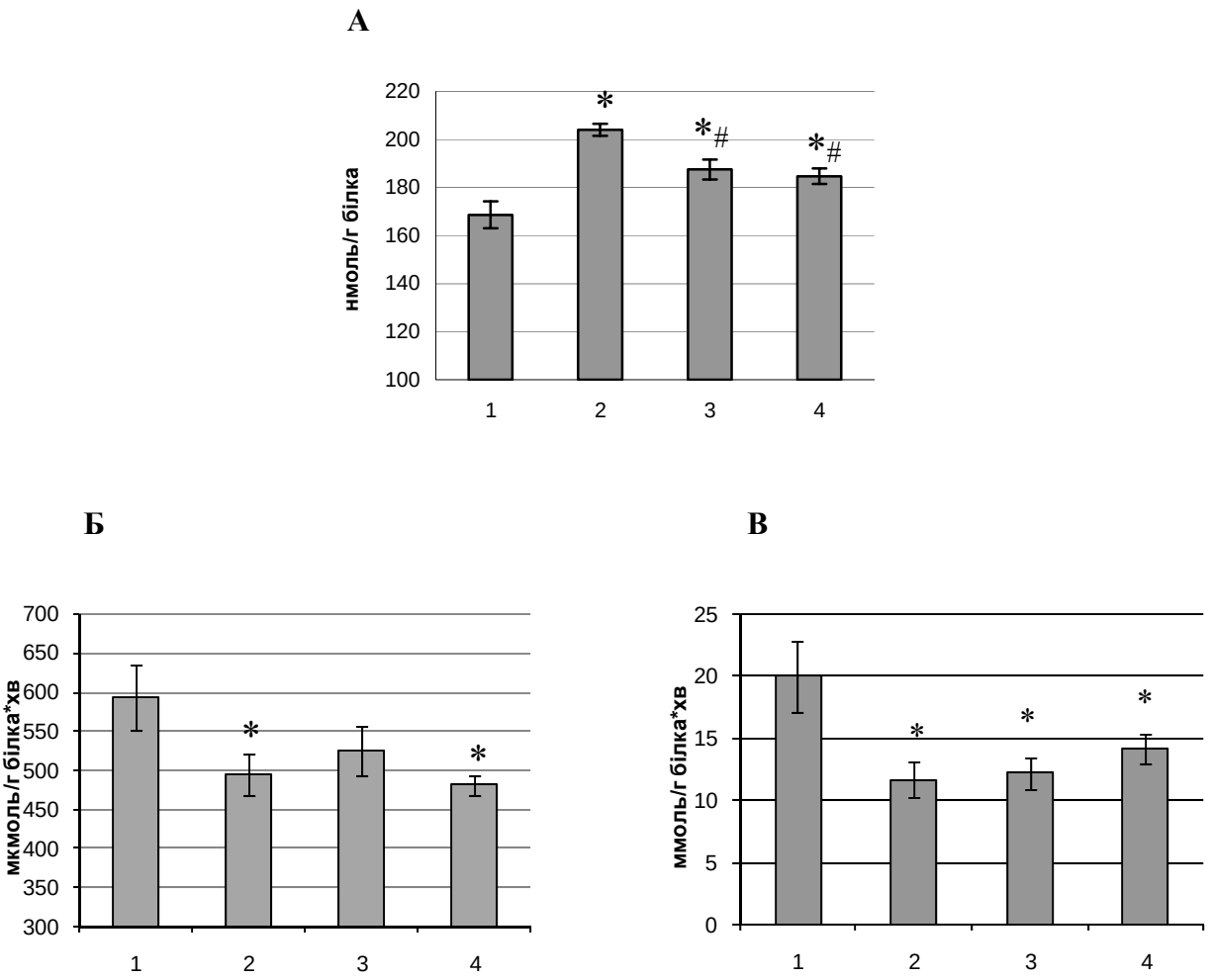


Рис. 2. Вміст ТБК-активних продуктів і активність глутатіонпероксидази та каталази у мозку щурів за умов ЕАЕ (M+m)
А — Вміст ТБК-активних продуктів; **Б** — активність глутатіонпероксидази;
В — активність каталази; нумерація груп аналогічна рис. 1;
*— достовірні зміни відносно інтактних; # — достовірні зміни відносно хворих тварин без корекції

Отже, отримані дані можуть свідчити про те, що вітамін D_3 у дозі 5 мкг на кг ваги справляє позитивний вплив на глутатіонову систему і стан процесів ПОЛ у мозку щурів за умов ЕАЕ, на відміну від вітамінної суміші з профілактичними дозами вітамінів. Як відомо, активація ПОЛ і зниження вмісту глутатіону в клітині можуть індукувати активацію процесу деградації сфінгомієліну і сприяти апоптозу клітин. У випадку ЕАЕ та РС це можуть бути клітини олігодендроцитарного типу.

Молярне співвідношення Х:СМ у клітині є важливою характеристикою її структурної і функціональної стабільності, а також може характеризувати стан клітинних рафтів, ділянок клітинної мембрани, що мають функції інтеграції сигнальних механізмів у клітині. Раніше було показано підвищення цього співвідношення на 21-у добу розвитку ЕАЕ, що корелювало із прискоренням у цей час синтезу сфінгомієліну та зниженням його вмісту у гліальних клітинах головного мозку щурів. Це наштовхувало на думку про активацію за умов ЕАЕ сфінгомієлінового циклу в олігодендроцитах, яка відбувається за умов індукції процесів апоптозу, коли метаболіти сфінгомієліну, а саме цераміди і сфінгозин, виступають у якості проміжної ланки передачі сигналу до прокаспази-3. Тому в цій роботі ми продовжили вивчення метаболізму сфінгомієліну за умов ЕАЕ, а також регуляції цього процесу в патологічних умовах.

При вивченні вмісту метаболітів сфінгомієліну за умов ЕАЕ виявлено достовірне підвищення вмісту сфінгозину у тканині мозку відносно контролю та цераміду у гліальній клітинній фракції (рис. 3).

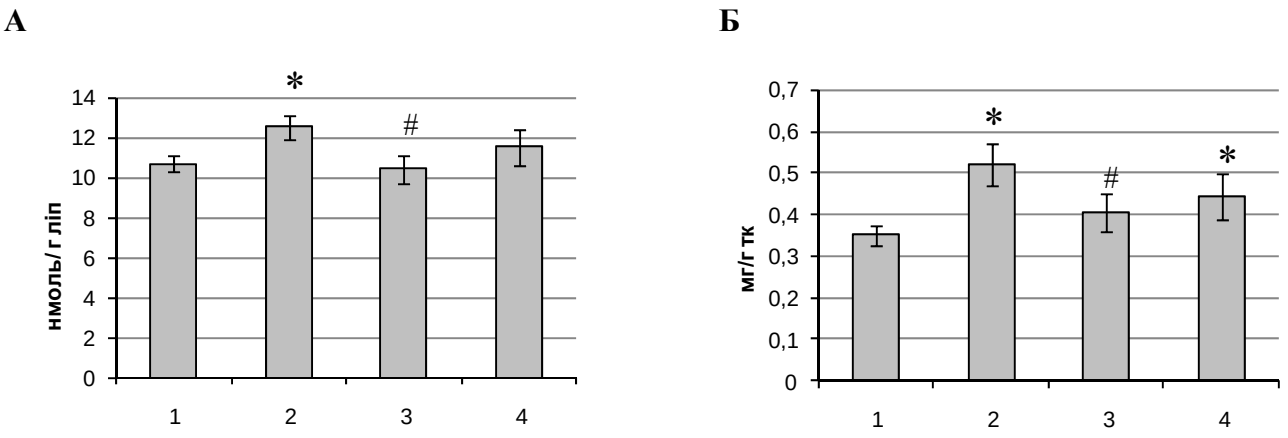
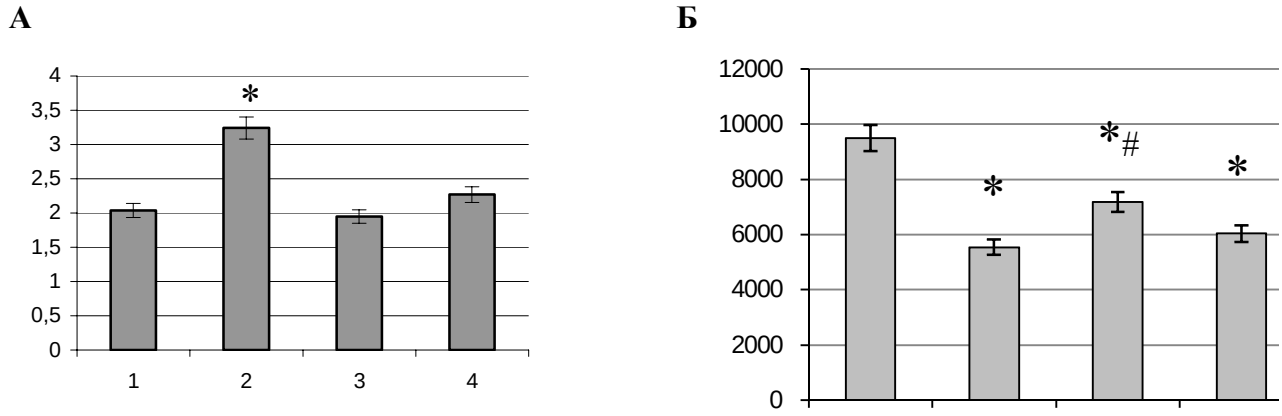


Рис. 3. Вміст вільного сфінгозину у мозку та цераміду у гліальних клітинах за умов ЕАЕ(M+m).
А — вміст вільного сфінгозину в тканині мозку; Б — вміст цераміду в гліальних клітинах;
нумерація груп аналогічна рис. 1; *— достовірні зміни відносно інтактних; # — достовірні зміни відносно хворих тварин без корекції

З рисунку 3 видно, що застосування окремо вітаміну D_3 у терапевтичній дозі також виявилося більш ефективним у попередженні зростання рівня цих показників у процесі розгортання хвороби, особливо рівня сфінгозину.

При визначенні співвідношення Х:СМ за умов ЕАЕ виявилося, що як вітамін D_3, так і вітамінна суміш, сприяють зниженню цього співвідношення, що може відображати нормалізацію функціонального стану мембран головного мозку щурів за умов ЕАЕ (рис. 4 А).

Зниження співвідношення СМ:Сф за умов ЕАЕ (рис. 4 Б), очевидно, означає порушення функціонування сфінгомієлінового циклу з ухилом у бік руйнування сфінгомієліну до більш низькомолекулярних сполук. Вітамін D_3 у застосованій дозі справляв на нього деякий позитивний вплив, у той час як суміш вітамінів практично не впливала на виявлене порушення в системі сфінгомієліну.



6+Рис. 4. Співвідношення Х:СМ та СМ: Сф у мозку щурів за умов ЕАЕ
А — співвідношення Х:СМ; Б — співвідношення СМ:Сф; нумерація груп аналогічна рис. 1;
*— достовірні зміни відносно інтактних; # — достовірні зміни відносно хворих тварин без корекції

Висновки

Отже, отримані дані можуть свідчити про те, що вітамін D_3 у застосованій дозі перешкоджає зниженню вмісту глутатіону в мозку та розвитку оксидативного стресу за умов ЕАЕ у щурів. Такий нормалізуючий вплив вітаміну D_3 можна пояснити його здатністю до активації γ-глутамілтранспептидази, що бере участь у метаболізмі глутатіону та інгібування індуцибельної NO-синтази. Напевно, саме впливом на глутатіонову систему і процеси ПОЛ у клітинах мозку можна пояснити його позитивний вплив на сфінгомієліновий цикл, що дуже

важливо у попередженні загибелі клітин нервової тканини шляхом апоптозу, яка опосередковується метаболітами сфінгомієліну. Кращий нормалізуючий вплив вітаміну D_3 у терапевтичній дозі на більшість досліджуваних показників у порівнянні з вітамінною сумішшю, очевидно, свідчить про те, що фізіологічного рівня біологічно-активних речовин, і зокрема вітаміну D_3, у харчових продуктах і профілактичних полівітамінних препаратах може бути недостатньо для подолання тих метаболічних змін, які розвиваються в процесі розгортання патологічного стану у хворих на РС, і його надходження необхідно коригувати, призначаючи його таким хворим у додатковій кількості.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати дають підставу й підґрунтя для проведення подальших досліджень з вивчення ролі порушення метаболізму сфінгомієліну у молекулярних механізмах патогенезу й розвитку аутоімунних демієлінізаційних захворювань, і зокрема РС. Також необхідно продовжувати вивчення регуляторної ролі вітаміну D_3, інших вітамінів та біологічно активних речовин у різних комбінаціях і дозах на порушені метаболічні процеси, ПОЛ і клітинного сигналінгу, кінцевою метою якого є створення ефективного препарату із урахуванням дозозалежного ефекту як кожної окремої біологічної сполуки, так і у складі комплексного препарату для лікування цього захворювання.

E. P. Pasichna, G. V. Donchenko, R. P. Morozova

EFFECT OF VITAMIN D3 AND COMPOSITION OF VITAMINS ON DEVELOPMENT OF OXIDATIVE STRESS AND LIPID DISBALANCE IN BRAIN TISSUES OF RATS AT EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS

S u m m a r y

Vitamin D_3 and composition of vitamins effect on development of oxidative stress and lipids metabolism disfunction, specifically on content of free SH-groups and TBA-active products, glutathionperoxidase and catalase activity in brain as well as cholesterol, sphingomyelin, ceramide and free sphingosine content in brain and glia cells of rats at experimental allergic encephalomyelitis (EAE) were studied. It was found, that vitamin D_3 was facilitating in free SH-groups content rising in brain of sick animals with symptoms presence, positively influenced on condition of brain lipid peroxide oxidation (TBA-active products content was reliably reduced) and antioxidant system. Herewith sphingosine content and molar ratio cholesterol/sphingomyelin in brain tissue as well as ceramide in glial brain cells fraction of sick animals were veraciously reducing. The obtained data are indicative of positive effect of vitamin D_3 on functioning glutathione system, sphingomyelin cycle, oxidative and antioxidant process activity in brain at EAE.

Э. П. Пасичная, Г. В. Донченко, Р. П. Морозова

ДЕЙСТВИЕ ВИТАМИНА D_3 И СМЕСИ ВИТАМИНОВ НА РАЗВИТИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ЛИПИДНОГО ДИСБАЛАНСА В ТКАНИ МОЗГА КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АУТОИММУННОМ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТЕ

А н н о т а ц и я

Изучали действие витамина D_3 и комплекса витаминов на развитие окислительного стресса и нарушений липидного метаболизма, а именно на содержание свободных SH-групп, ТБК-активних продуктов, активность глутатионпероксидазы и каталазы в мозге, а также холестерола, сфингомиелина, церамида и свободного сфингозина в мозге и клетках глии крыс при ЕАЕ. Обнаружено, что витамин D_3 способствовал увеличению содержания свободных SH-групп в мозге больных животных при наличии симптомов заболевания, положительно влиял на состояние перекисного окисления липидов мозга (содержание ТБК-активних продуктов достоверно уменьшалось) и антиоксидантной системы. При этом происходило достоверное снижение у больных животных содержания сфингозина и молярного соотношения холестерол/сфингомиелин в ткани мозга, а также церамида в глиальной клеточной фракции

мозга. Полученные данные могут свидетельствовать о положительном влиянии витамина D_3 на функционирование системы глутатиона, сфингомиелинового цикла, активность перекисных и антиоксидантных процессов в мозге при ЕАЕ.

1. *Brown D. A.* Biol Chem. / D. A. Brown, E. J. London. — 2000. — 275. — N 23. — P. 17221–17224.
2. *Boulerne A. J.* J. Neurosci. Res. / A. J. Boulerne, L. Nedelkosko, J. A. Benjamins. — 63. — N 2. — P. 124–135.
3. *Хохлов А. П.* Миелинопатии и демиелинизирующие заболевания / А. П. Хохлов, Ю. Н. Савченко. — М. : Медицина, 1990. — 208 с.
4. *Pitt D.* Neurology / D. Pitt, P. Werner, C. S. Raine. — 2000. — N 54 (Suppl. 3). — P. A258–A259.
5. *Одинак М. М.* Неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова (прил. «Рассеянный склероз») / М. М. Одинак, Г. К. Бисага, И. В. Зарубина. — 2003. — № 1. — С. 72–75.
6. *Віничук С. М.* Укр. мед. Часопис / С. М. Віничук, Г. В. Донченко, О. О. Копчак и др. — 2004. — 43. — № 5. — С. 36–42.
7. *Manggau M.*, Kim D. S., Ruwisch L. et al. // Invest Dermatol. — 2001. — 117. — N 5. — P. 1241–1249.
8. *Garcion E.* J. Neurochem / E. Garcion, L. Sindji, G. Leblondel et al. — 1999. — 73. — N 2. — P. 859–866.
9. *Pedersen L. B.* Journal of Neurosci Res. / L. B. Pedersen, F. E. Nashold, K. M. Spach and C. E. Hayes. — 2007. — 85, N 11. — P. 2480–2490.
10. *Cantorna M. T.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA / M. T. Cantorna, C. E. Hayes, H. F. DeLuca . — 1996. — 93. — P. 7861–7864.
11. *Флеров М. А.* Вопросы мед. химии / М. А. Флеров. — 1978. — № 2. — С. 174–180.
12. *Folch J.* J Biol Chem. / J. Folch, M. B. Lees, G. H. Sloane Stanley. — 1957. — 226. — N1. — P. 497–509
13. *Vaskovsky V. E.* J. Chromatogr. / V. E. Vaskovsky, E. Y. Kostetsky, J. M. Vasendin. — 1975. — 114. — N 1. — P. 129–141.
14. *Carl J. Lauter.* J. Lipid Res. / J. Carl Lauter, E. G. Trams. — 1962. — 3. — P. 136–138.
15. *Дятловицкая Э. В.* Биохимия / Э. В. Дятловицкая. — 1999. — 60, № 8. — С. 1302–1306.
16. *Ellman G. L.* Arch. Biochem. Biophys. / G. L. Ellman. — 1959. — N 82. — P. 70–77.
17. *Власова С. Н.* Лаб. дело / С. Н. Власова, Е. И. Шабунина. — 1990. — № 8. — С. 19–22.
18. *Чевари С. Т.* Лаб. дело / С. Т. Чевари, Т. Андял. — 1991. — № 10. — С. 9–13.
19. *Стальная И. Д.* Совр. методы в биохимии / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили ; под ред. О. Н. Ореховича. — М. : Медицина, 1977. — С. 66–68
20. *Larson E.* Anal. Biochem. / E. Larson, B. Hawlett, A. Jagendorf. — 1986. — 155. — N 2. — P. 243–248.

Рецензент: г. н. сп. лабораторії живлення ВРХ, д. б. н., професор В. Г. Янович.