

ВПЛИВ МЕТАЛІВ-МІКРОЕЛЕМЕНТІВ НА БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ БАКТЕРІЙ-ПРОБІОНТІВ

Л. С. РЄЗНІЧЕНКО, Т. Г. ГРУЗИНА, В. В. ВЕМБЕР, З. Р. УЛЬБЕРГ

Інститут біологічної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України, Київ;
e-mail: tgruzina@mail.ru

З метою створення комплексних металовмісних пробіотичних препаратів досліджено вплив металів-мікроелементів Zn, Cu, Ag, Au у колоїдній та іонній формах на основні біохімічні показники (АТР-азну активність, трансмембранний потенціал та респіраторну активність) штамів-пробіонтів *Escherichia coli* Г35 №1-413 та *Enterococcus faecalis* Г35 №4-410. Встановлено, що всі зазначені метали в іонній формі монотонно дозозалежно інгібують функціональну активність бактерій. Колоїди металів у тих самих концентраційних межах виявляють достовірну стимулювальну дію на біохімічні показники мікроорганізмів з максимумом позитивного ефекту при концентраціях за металом: Zn – $2 \cdot 10^{-7}$ – $2 \cdot 10^{-4}$ мг/мл, Cu – $8,4 \cdot 10^{-7}$ – $8,4 \cdot 10^{-6}$ мкг/мл, Ag – $23 \cdot 10^{-7}$ – $23 \cdot 10^{-4}$ мкг/мл, Au – $5 \cdot 10^{-6}$ мкг/мл. Показано, що культуральні характеристики бактерій-пробіонтів у присутності як іонів, так і колоїдів зазначених металів залишаються стабільними. Достовірна стимуляція ключових ферментів та процесів життєзабезпечення бактерій-пробіонтів колоїдними формами вивчених металів-мікроелементів у встановлених межах концентрацій та розмірності свідчить про можливість застосування їх у складі пробіотичних препаратів для підвищення стійкості та функціональної активності мікроорганізмів-пробіонтів.

Ключові слова: штамі-пробіонти, метали-мікроелементи, стимуляція, АТР-азна активність, трансмембранний потенціал, респіраторна активність.

В умовах збільшення кількості негативних факторів, які впливають на організм людей і тварин, особливої актуальності набуває відновлення та підтримка внутрішнього гомеостазу організму. Найвразливішими його ланками, які одними з перших зазнають руйнівного впливу, є власна мікрофлора та мікроелементний стан. Ці компоненти внутрішнього середовища тісно пов'язані і впливають один на одного, тому зазвичай наслідком негативних змін різної етіології в організмі є одночасний розвиток мікроелементозів та дисбактеріозів [1–3].

Одним з ефективних засобів корекції дисбіотичних станів та мікроелементозів різноманітного походження є біотерапія, головними компонентами якої є пробіотики та вітамінно-мінеральні комплекси [1, 4–7]. Однак масове застосування цих препаратів породжує низку проблем, що потребують пошуків шляхів ефективного їх вирішення.

З одного боку, звичайно до складу вітамінно-мінеральних комплексів входять неорганічні солі есенціальних металів-мікроелементів, які в більшості випадків мають низькі засвоюваність та поріг допустимої концентрації [5,7].

З іншого боку, мікроорганізми, що входять до складу пробіотичного препарату, зазнають значного агресивного впливу з боку середовища шлунка та жовчі [8, 9]. Тому пошук субстанцій, які сприятимуть підвищенню стійкості мікроорганізмів-пробіонтів, є досить актуальним.

Відомо, що метали-мікроелементи виявляють значний позитивний вплив на життєдіяльність мікроорганізмів [10]. Тому можна припустити, що створення комплексних пробіотичних препаратів, до складу яких окрім штамів-пробіонтів будуть входити також метали-мікроелементи, може сприяти вирішенню двох актуальних проблем: по-перше, підвищенню стійкості та функціональної активності мікроорганізмів-пробіонтів; по-друге, ці пробіотичні препарати можуть бути джерелом біоадаптованих металів-мікроелементів.

З огляду на вищезазначене, метою даної роботи було вивчення характеру впливу металів-мікроелементів на функціональний стан бактерій-пробіонтів у процесі створення комплексних металовмісних пробіотичних препаратів.

Матеріали і методи

Як об'єкт досліджень в роботі було використано бактерії-пробіоти *Escherichia coli* Г35 №1-413 та *Enterococcus faecalis* Г35 №4-410, виділені зі шлунково-кишкового тракту умовно-здорових людей і задепоновані в депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (Київ).

Клітини вирощували в колбах на качалці при 37 °С в рідкому середовищі Luria-Bertani (LB). Після 24 годин культивування клітини, що знаходились у стаціонарній фазі росту, осаджували центрифугуванням (6000 об/хв, 10 хв), відмивали від поживного середовища фізіологічним розчином, концентрували та використовували в подальших експериментах.

Гідрозоль міді одержували методом [11], гідрозолі золота, срібла та цинку – згідно з [12].

Для одержання іонів використовували розчини таких солей: $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $AgNO_3$, $HAuCl_4$. Іонні та колоїдні метали було використано в ідентичних концентраційних діапазонах у перерахунку на метал і складала для: Zn – $2 \cdot 10^{-7}$ – 2 мг/мл, Cu – $8,4 \cdot 10^{-9}$ – $8,4$ мкг/мл, Ag – $23 \cdot 10^{-8}$ – 23 мкг/мл, для золота в іонній формі – $6 \cdot 10^{-8}$ – 6 мкг/мл, а в колоїдній – $5 \cdot 10^{-9}$ – 5 мкг/мл. Вибір концентраційних діапазонів обумовлено раніше встановленим дозозалежним впливом цих металів на ростові процеси бактерій-пробіотів [13].

Культурально-біохімічну ідентифікацію штамів здійснювали за допомогою стандартних біохімічних тестів Micro-1a-TEST: “Enterotest 16” та “API 20 Step” виробництва фірми «Pliva-Lachema» та «Bio-Merieux» (Франція).

Фракцію плазматичних мембран (ПМ) із клітин бактерій-пробіотів одержували раніше описаним методом [14] та кількісно характеризували за наявністю білка, який визначали методом Лоурі [15].

Величину АТР-азної активності препаратів ПМ реєстрували за швидкістю накопичення неорганічного фосфору (P_i), концентрацію якого в середовищі визначали методом Фіске-Суббароу [16] та оцінювали у відносних одиницях A/A_0 , де A_0 – швидкість АТР-азної реакції інтактних ПМ, A – той самий показник для модифікованих під впливом металів-мікроелементів препаратів ПМ.

Вимірювання величини трансмембранного потенціалу ($\Delta\phi$) клітин проводили потенціометричним методом із застосуванням проникних TPP^+ -іонів, концентрацію яких у середовищі визначали селективним TPP^+ -чут-

ливим електродом. Як електрод порівняння використано стандартний хлорсрібний електрод [17, 18].

Величину $\Delta\phi$ розраховували за рівнянням Нернста та виражали у відносних одиницях m/m_0 , де m_0 – величина $\Delta\phi$ інтактних клітин, m – той самий показник для модифікованих під дією металів-мікроелементів штамів.

Респіраторну активність (РА) вимірювали за допомогою кисневого електроду Кларка, MO128 («Mettler Toledo», Швейцарія) [19]. Вимірюваним параметром була максимальна швидкість зниження концентрації кисню в середовищі вимірювання приведена до одиниці біомаси використаного бактеріального штаму (питома РА).

Вплив металів-мікроелементів на пробіотичні бактерії оцінювали за рівнем ендогенного, а також енергизованого глюкозою дихання (кінцева концентрація глюкози – 0,1%) у присутності різних концентрацій та форм металів-мікроелементів. Результати представлено у відносних одиницях RA/RA_0 , де RA_0 – респіраторна активність інтактних клітин, RA – цей показник для пробіотичних бактерій у присутності певних доз металів-мікроелементів.

У роботі було використано АТР, трис-гідроксиметиламінометан, LB-бульйон («Gibco RBL», Шотландія). Інші реактиви були вітчизняного виробництва кваліфікації х.ч.

На графіках наведено середні значення параметрів не менше, ніж 3-х повторностей у серії з п'яти незалежних експериментів.

Статистичну обробку результатів проводили згідно з [20] з використанням критерію Стьюдента ($P < 0,05$).

Результати та обговорення

З метою дослідження впливу металів-мікроелементів на функціональний стан бактерій-пробіотів було обрано чотири метали: Zn, Cu, Ag, Au в колоїдній та іонній формах. Вивчення дії обох форм обумовлено даними про значно меншу токсичність колоїдних частинок у ширшому концентраційному діапазоні порівняно з іонною формою для тих самих металів [21].

Дослідження впливу вищезазначених металів пов'язано з їхньою важливою біохімічною функцією. А саме, цинк є есенціальним мікроелементом, необхідним для нормального функціонування як прокаріотичних, так і еукаріотичних організмів [5, 22]. Його дефіцит впливає в першу чергу на цілісність мембранних структур. Порушення обміну цинку виявлено за багатьох патологій, у тому числі в разі

дисбіотичних станів різної етіології [23]. Дефіцит міді також спостерігається в багатьох випадках дисбактеріозів [5, 23]. Срібло виявляє виражену бактерицидну дію відносно різних патогенів, тому застосування його в комплексній терапії дисбактеріозів та гострих кишкових захворювань є досить перспективним [24]. Колоїдне золото виявляє позитивну дію на запальні процеси різноманітної етіології, тому воно є також перспективним компонентом в терапії патологічних станів різноманітного походження, в тому числі дисбактеріозів, гострих кишкових захворювань та запальних процесів [25].

Для аналізу функціонального стану штамів-пробіотів за взаємодії з вищезазначеними мікроелементами реєстрували основні біохімічні показники, які є досить чутливими до дії різних факторів навколишнього середовища, тому можуть слугувати ефективними індикаторами загального фізіологічного стану пробіотичних мікроорганізмів.

Одержані нами раніше експериментальні дані свідчать про енергозалежний механізм взаємодії металів у колоїдній та іонній формах із клітинами бактерій [26, 27]. Тому найбільш адекватними індикаторами функціонального стану пробіотів можуть слугувати насамперед ферменти та процеси енергетичного метаболізму, локалізовані у плазматичній мембрані, а саме АТР-азна активність, трансмембранний потенціал та респіраторна активність.

Мембранна АТР-аза є одним із ключових ферментів енергетичного метаболізму клітини, завдяки якому відбувається формування різниці електрохімічних потенціалів на мембрані.

Показано, що абсолютні значення питомої АТР-азної активності ПМ бактерій-пробіотів складають у середньому 2500 ± 50 нмоль P_i /хв на 1 мг білка для *E. coli* Г35 №1-413 та 1250 ± 30 нмоль P_i /хв на 1 мг білка для *Ent. faecalis* Г35 №4-410.

Аналіз результатів досліджень з впливу металів на активність мембранної АТР-ази показує, що іонні форми Zn, Cu, Ag та Au у вивчених концентраційних межах дозозалежно монотонно пригнічують величину АТР-азної активності плазматичних мембран обох штамів вивчених бактерій. Характерна крива, яка відображає інгібування їх мембранної АТР-ази іонними формами металів наведена на прикладі дії іонів золота на штам *E. coli* Г35 №1-413 (рис. 1, крива 2).

Вивчення впливу колоїдних форм зазначених металів виявило достовірний стимулю-

вальний ефект за певних концентрацій, тобто концентраційні межі та характер позитивного впливу були однаковими для обох мікроорганізмів. Типові для цих штамів криві наведено на прикладі *E. coli* Г35 №1-413 (рис. 1, криві 1, 3–5). Так, колоїд цинку при концентраціях $2 \cdot 10^{-7}$ – $2 \cdot 10^{-4}$ мг/мл за металом достовірно на 30% стимулює процес гідролізу АТР у вивчених штаммах (крива 5), а колоїдна мідь у концентраційному діапазоні $8,4 \cdot 10^{-9}$ – $8,4$ мкг/мл виявляє достовірне підвищення АТР-азної активності при концентрації колоїду $8,4 \cdot 10^{-7}$ – $8,4 \cdot 10^{-6}$ мкг/мл (крива 3). Колоїд срібла в межах $23 \cdot 10^{-8}$ – 23 мкг/мл проявляє стимулювальний ефект з максимумом дії при концентраціях $23 \cdot 10^{-7}$ – $23 \cdot 10^{-4}$ мкг/мл (крива 4). Що стосується колоїдного золота (наночастинки розміром 10–20 нм), то слід підкреслити його неоднозначний вплив на АТР-азну активність вивчених культур. Колоїдне золото в концентрації $5 \cdot 10^{-7}$ – $5 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл стимулює АТР-азну активність з максимальним проявом ефекту при концентрації $5 \cdot 10^{-6}$ мкг/мл. У вищих концентраціях цей метал пригнічує реакцію гідролізу АТР (крива 1).

Достовірний стимулювальний ефект колоїдів металів-мікроелементів на мембранну АТР-гідролазу, на відміну від інгібувального впливу іонної форми, пов'язаний, на наш пог-

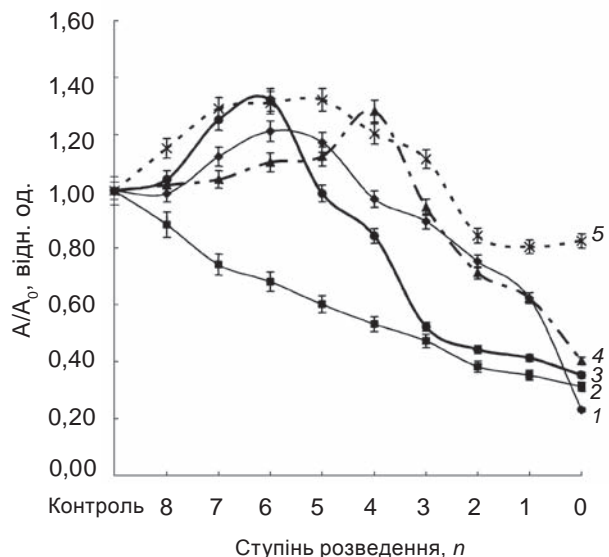


Рис. 1. Вплив металів на АТР-азну активність (A/A_0) *E. coli* Г35 №1-413: колоїдне золото ($5 \cdot 10^{-n}$ мкг/мл; крива 1); іонне золото ($6 \cdot 10^{-n}$ мкг/мл; крива 2); колоїдна мідь ($8,4 \cdot 10^{-n}$ мкг/мл; крива 3); колоїдне срібло ($23 \cdot 10^{-n}$ мкг/мл; крива 4); колоїдний цинк ($2 \cdot 10^{-n}$ мг/мл; крива 5)

ляд, перш за все з особливостями взаємодії різних форм металів з поверхнею мембран бактерій та відмінностями в розмірах частинок.

Відомо, що трансмембранний потенціал ($\Delta\phi$), що формується на плазматичній мембрані бактерій внаслідок перерозподілу іонів між цитоплазмою і зовнішнім середовищем при функціонуванні АТР-гідролази та інших клітинних генераторів, є інтегральним показником інтенсивності мембранних процесів трансформації енергії і значною мірою проявляє високу чутливість до дії металів.

Проведені експерименти показали, що абсолютна величина трансмембранного потенціалу, обчислена за формулою Нернста, досягає для клітин *E. coli* Г35 №1-413 в середньому 200 мВ, а для *Ent. faecalis* Г35 №1-410 ~ 180 мВ.

Вплив іонних форм Zn, Cu, Ag і Au виявив інгібувальну дозозалежну дію на $\Delta\phi$ обох вивчених штамів-пробіонтів. Колоїди цих металів виявляють стимулювальний ефект при дії на обидва штами з максимумами для: Zn – в межах $2 \cdot 10^{-6}$ – $2 \cdot 10^{-5}$ мг/мл, Cu – $8,4 \cdot 10^{-7}$ мкг/мл, Ag – $23 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл, Au – $5 \cdot 10^{-6}$ мкг/мл за металом (рис. 2).

Таким чином, колоїдна форма металів, що вивчалися, на відміну від іонної, в певних концентраційних межах достовірно активує процес генерації $\Delta\phi$ у досліджених мікроорганізмів.

Що стосується респіраторної активності бактерій-пробіонтів, то проведені дослідження показали, що абсолютні значення ендogenous респіраторної активності для бактерій-пробіонтів складають в середньому $3,0 \pm 0,25$ мг O_2 /(л·хв·мг біомаси) для клітин *E. coli* Г35

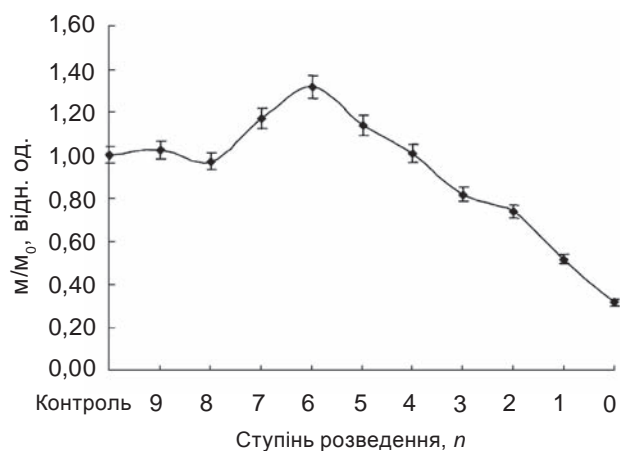


Рис. 2. Вплив колоїдного золота ($5 \cdot 10^{-n}$ мкг/мл) на величину трансмембранного потенціалу (M/M_0) *E. coli* Г35 №1-413

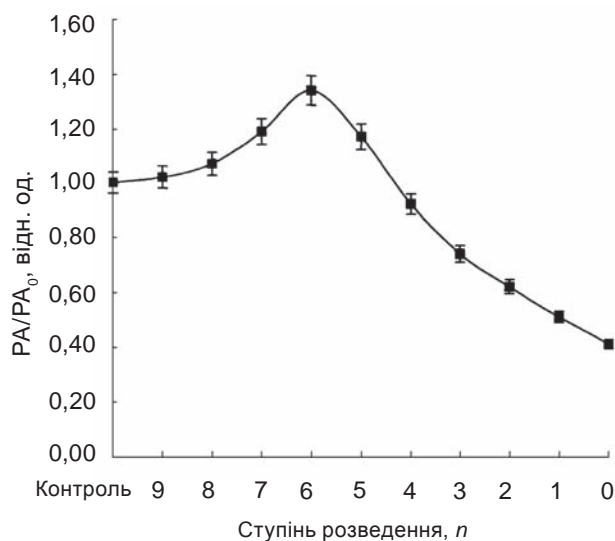


Рис. 3. Вплив колоїдного золота ($5 \cdot 10^{-n}$ мкг/мл) на респіраторну активність (PA/PA_0) *E. coli* Г35 №1-413

№1-413 та $2,5 \pm 0,20$ мг O_2 /(л·хв·мг біомаси) для клітин *Ent. faecalis* Г35 №1-410, а респіраторна активність у разі енергізації глюкозою складає $5,0 \pm 0,41$ мг O_2 /(л·хв·мг біомаси) та $4,2 \pm 0,24$ мг O_2 /(л·хв·мг біомаси) відповідно.

Встановлено, що іони Au, Ag, Cu та Zn у вивчених концентраційних діапазонах монотонно пригнічують дихальну активність бактерій-пробіонтів. Колоїдні ж форми цих металів мали концентраційні максимуми активації дихальної активності, окрім цинку, колоїдні частинки якого практично не змінювали інтенсивність респіраторної реакції як у разі ендogenous, так і у разі енергізованого дихання. На рис. 3 наведено криву, що відображає характер впливу колоїдного золота на штам *E. coli* Г35 №1-413. Колоїди Ag та Cu достовірно стимулюють інтенсивність споживання кисню клітинами обох штамів при концентраціях $23 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл та $8,4 \cdot 10^{-7}$ мкг/мл відповідно.

Обов'язковою вимогою до штамів-компонентів пробіотичного препарату є незмінність їхніх культурально-біохімічних ознак під впливом зовнішніх факторів [8,9]. Тому в подальшому було проведено дослідження культурально-біохімічних властивостей бактерій-пробіонтів у присутності Zn, Cu, Ag і Au як в іонній, так і в колоїдній формах. Результати експериментів засвідчили, що культуральні характеристики бактерій-пробіонтів у присутності як іонів, так і колоїдів вивчених металів залишаються стабільними після 5 пасажів.

Одержані результати досліджень дозволяють дійти висновку, що стимулювальний вплив колоїдів (наночастинок) Zn, Cu, Ag і Au на біохімічні показники бактеріальних культур-пробіонтів найбільш вірогідно пов'язаний з їхньою розмірністю та характером взаємодії з поверхнею клітин і везикул їхніх плазматичних мембран.

Достовірна стимуляція ключових ферментів та процесів життєзабезпечення бактерій-пробіонтів колоїдними формами досліджених металів-мікроелементів у встановлених концентраційних межах та розмірності свідчить про можливість їх застосування у складі пробіотичних препаратів для підвищення стійкості та функціональної активності мікроорганізмів-пробіонтів.

Інгібувальний вплив металів-мікроелементів в іонній формі на процеси життєзабезпечення порівняно з колоїдними їх формами, є свідченням переваги колоїдних металів як джерела мікроелементів для організму. Комбінація наночастинок металів-мікроелементів з бактеріями-пробіонтами є перспективною для конструювання мінеральних комплексів з мікроелементами у біоадаптованій формі.

ВЛИЯНИЕ МЕТАЛЛОВ-МИКРОЭЛЕМЕНТОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ БАКТЕРИЙ-ПРОБИОНТОВ

*Л. С. Резниченко, Т. Г. Грузина,
В. В. Вембер, З. Р. Ульберг*

Институт биокolloидной химии
им. Ф. Д. Овчаренко НАН Украины, Киев;
e-mail: tguzina@mail.ru

С целью создания комплексных металлосодержащих пробиотических препаратов исследовано влияние металлов-микроэлементов (Zn, Cu, Ag, Au) в коллоидной и ионной формах на основные биохимические показатели (АТФ-азную активность, трансмембранный потенциал и респираторную активность) штаммов-пробіонтов *E. coli* Г35 №1-413 и *Ent. faecalis* Г35 №4-410. Установлено, что все указанные металлы в ионной форме монотонно дозозависимо ингибируют функциональную активность бактерий. Коллоиды металлов в тех же границах концентраций проявляют достоверное стимулирующее действие на биохимические показатели микроорганизмов с максимумом позитивного эффекта при концентрациях: Zn — $2 \cdot 10^{-7}$ – $2 \cdot 10^{-4}$ мг/мл, Cu — $8,4 \cdot 10^{-7}$ – $8,4 \cdot 10^{-6}$ мкг/мл, Ag — $23 \cdot 10^{-7}$ – $23 \cdot 10^{-4}$ мкг/мл, Au — $5 \cdot 10^{-6}$ мкг/мл

по металлу. Показано, что культуральные характеристики бактерий-пробіонтов в присутствии как ионов, так и коллоидов изученных металлов остаются стабильными. Достоверная стимуляция ключевых ферментов и процессов жизнеобеспечения бактерий-пробіонтов коллоидными формами изученных металлов-микроэлементов в установленных границах концентраций и размерности свидетельствует о возможности их использования в составе пробиотических препаратов для повышения устойчивости и функциональной активности микроорганизмов-пробіонтов.

Ключевые слова: штаммы-пробіонты, металлы-микроэлементы, стимуляция, АТФ-азная активность, трансмембранный потенциал, респираторная активность.

INFLUENCE OF METALS-MICROELEMENTS ON BIOCHEMICAL INDICES OF PROBIONT-BACTERIA

*L. S. Reznichenko, T. G. Gruzina,
V. V. Vember, Z. R. Ulberg*

Institute of Biocolloidal Chemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: tguzina@mail.ru

Summary

The influence of metal-microelements (Zn, Cu, Ag, Au) in colloid and ionic form on the main biochemical parameters (ATP-ase activity, transmembrane potential and respiratory activity) of *E. coli* Г35 №1-413 and *Ent. faecalis* Г35 №4-410 probiont-strains has been studied with the goal to create complex metal-bearing probiotic preparations.

Monotonous dose-dependent inhibitory influence of all mentioned metals in ionic form on the bacteria functional activity has been established.

Metals' colloids had certainly stimulating influence on microorganisms' biochemical parameters in the same concentration limits with the following maximum positive effects: for Zn — $2 \cdot 10^{-7}$ – $2 \cdot 10^{-4}$ mg/ml, for Cu — $8,4 \cdot 10^{-7}$ – $8,4 \cdot 10^{-6}$ µg/ml, for Ag — $23 \cdot 10^{-7}$ – $23 \cdot 10^{-4}$ µg/ml, for Au — $5 \cdot 10^{-6}$ µg/ml by metals.

It has been shown, that cultural characteristics of probiont-bacteria in the presence of both ionic and colloid forms of studied metals remain stable.

Certain stimulation of probiont-bacteria' main enzymes and life-support processes by colloidal forms of the studied metals-microelements in determined concentration and particle dimen-

sion limits is the evidence of a possibility of metals' colloids application in probiotic preparations' composition in order to increase the resistance and functional activity of probiont-microorganisms.

Key words: probiont-strains, metals-microelements, stimulation, АТР-ase activity, transmembrane potential, respiratory activity.

1. Лобзин Ю. В., Макарова В. Г., Корвякова Е. Р., Захаренко С. М. Дисбактериоз кишечника (клиника, диагностика, лечение): Руководство для врачей. — Спб.: "Издательство Фолиант", 2003. — 256 с.
2. Каширская Н. Ю. // Русск. мед. журн. — 2000. — 8, № 13–14. — С. 572–575.
3. Калетина Н. И. // Микроэлементы в медицине. — 2004. — 5 (3). — С.23–27.
4. Бондаренко В. М., Воробьев А. А. // Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол. — 2004. — № 1. — С. 84–92.
5. Горбачев В. В., Горбачева В. Н. Витамины, микро- и макроэлементы: Справочник. — Мн.: Кн. Дом: Интерпресс-сервис, 2002. — 544 с.
6. Попова Т. С., Шрамко Л. У., Порядков Л. Ф. и др. // Клини. медицина. — 2001. — 79, № 4. — С. 4–9.
7. Мазо В., Скальный А., Гмошинский И. // Врач. — 2003. — № 5. — С. 34–36.
8. Лясковский Т. М., Подгорский В. С. // Микробиол. журн. — 2005. — 67, № 6. — С. 104–112.
9. Усенко Д. В., Горелов А. В. // Вопр. соврем. педиатрии. — 2004. — 3, № 2. — С. 50–54.
10. Новик Г. И., Астапович Н. И., Самарцев А. А. // Прикл. биохим. и микробиол. — 2001. — 37, № 3. — С. 317–325.
11. Наумов В. Химия коллоидов. — М., 1932. — С. 51.
12. Методические разработки к практикуму по коллоидной химии / под ред. А. В. Перцова. — М.: Изд-во МГУ, 1976. — 132 с.
13. Грузина Т. Г., Вембер В. В., Немиро С. А. и др. // Доп. НАНУ. — 2004. — № 3. — С. 154–158.
14. Карамушка В. И., Ульберг З. Р., Грузина Т. Г. // Укр. біохім. журн. — 1990. — 62, № 1. — С. 76–82.
15. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. — 1951. — 193. — P. 265–275.
16. Fiske C., Subbarow J. // Ibid. — 1925. — 66, N 1. — P. 375–400.
17. Гринюс Л. Л., Даугелавичюс Р. Ю., Алькимавичюс Г. А. // Биохимия. — 1980. — 45, № 9. — С. 1609–1618.
18. Грузина Т. Г., Балакина М. Н., Ульберг З. Р. // Укр. біохім. журн. — 2000. — 72, № 2. — С. 72–76.
19. Грузина Т. Г., Вембер В. В., Задорожня А. М. и др. // Химия и технол. воды. — 2005. — 27, № 4. — С. 385–391.
20. Лакин Г. Ф. Биометрия: учебное пособие для биологических специальностей ВУЗов. — М: Высш. школа, 1990. — 352 с.
21. Вембер В. В., Грузина Т. Г., Чехівська Т. П. та ін. // Наукові вісті НТУУ «КПІ». — 2003. — № 6. — С. 132–137.
22. Фавье М., Хининджер-Фавье И. // Микроэлементы в медицине. — 2002. — 3 (4). — С. 2–6.
23. Горелова Ж. Ю., Александровский С. Б., Орлова О. И. // Микроэлементы в медицине. Материалы I съезда РОСМЭМ. — 2005. — 6 (2). — С. 21–22.
24. Харитонов М. А., Кауфман С. А., Бражник М. С. Соединения серебра и их аммиачные растворы в медицине. — М.: Изд. Перв. московск. мед. ин-та, 1936. — 44 с.
25. Lehr C.-M. Abstracts of Ukrainian-German Symp. on Nanobiotechnology / Kyiv, December 2006. — Kyiv, 2006. — P. 96.
26. Грузина Т. Г., Степура Л. Г., Ульберг З. Р. // Укр. біохім. журн. — 1997. — 69, № 1. — С. 54–59.
27. Грузина Т. Г., Степура Л. Г., Ульберг З. Р. // Микробиология. — 1977. — 66, № 1. — С. 14–18.

Отримано 19.03.2007