

Р. А. СТЕПАНЯН, А. А. СИМОНЯН, Р. Б. БАДАЛЯН

ГЛИКОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ МОЗГОВОЙ ТКАНИ КУР

Литературные данные относительно гликолитических свойств митохондрий, выделенных из мозговой ткани, до сих пор противоречивы. Часть их показывает, что гликолитический процесс в центральной нервной системе в основном протекает в растворимой фракции [23, 25, 36]. Однако в иных работах мозговые митохондрии, в отличие от других органов [18], обладают способностью гликолитическим путем расщеплять до лактата как глюкозу, так и ее фосфорилированные производные [17, 19, 20, 26, 27, 33, 34]. Одновременно известно, что гликолитические ферменты локализованы в гиалоплазме, но их активность и степень действия могут быть связаны с субцеллюлярными структурами. Некоторые из них, по-видимому, тесно связаны со структурами [2, 7, 39, 40]. Согласно литературным данным, в условиях опыта *in vitro*, митохондрии, добавленные в реакционную смесь, в зависимости от условий, либо тормозят, либо активируют гликолиз. В этом случае тормозящее влияние митохондрий на гликолитическую активность проявляется при добавлении их в больших количествах. Что касается эндоплазматического ретикулула, то в его присутствии только усиливается гликолитическая активность гиалоплазмы мышечной ткани [34, 40]. Влияние митохондрий и эндоплазматического ретикулула на гликолиз объясняется по-разному. Предполагается, что оно связано с активностью АТФ-азы, суть которого заключается в регулировании уровней АТФ, АДФ и неорганического фосфата [6, 31, 35]. Нейфахом [5] показано, что в гиалоплазму митохондрий выделяют фактор, стимулирующий гликолиз.

Электронномикроскопическое исследование митохондриальной фракции мозговой ткани показало, что в ней, кроме митохондрий, содержится также немитохондриальное образование — обломки мембран и миелина, а также синаптические пузырьки и окончания [25, 30, 41, 44]. Как видно, определенно нельзя утверждать, что митохондрии мозговой ткани обладают гликолитическим свойством. В пользу этого предположения говорят и другие факты. В работах Танака и Эбуд [44], а также Руцака и сотр. [8, 43] и других авторов [24] чистые митохондрии, выделенные в градиенте плотности сахарозы, лишены гликолитических свойств.

В данной работе мы задались целью исследовать гликолитическую

активность в различных субклеточных фракциях мозговой ткани кур— в гомогенате, митохондриальном супернатанте, в суммарной, а также в субфракциях митохондрий. Часть исследования заключалась в изучении гликолиза в системе митохондриальный супернатант+различные фракции митохондрий.

Материал и методика. Опыты ставились на митохондриях, выделенных из мозга кур породы белый леггорн. Гомогенизацию мозговой ткани проводили в 0,25 М маннит—0,02 М трис—HCl буфере (pH 7,4) в гомогенизаторе типа Поттера с тефлоновым пестиком [42], в течение 30 сек. При центрифугировании в течение 10 мин при 800 g были выделены ядра и цитоплазматические обломки. Супернатант, содержащий гиалоплазму (гликолитические ферменты в основном локализованы в этой фракции), митохондрии и внутримитохондриальный ретикулум был отобран для опыта и условно назван «безъядерным гомогенатом». Для получения гиалоплазмы, содержащей эндоплазматический ретикулум (но не митохондрии), гомогенат центрифугировали в течение 20 мин при 22000 g [9]. Эту фракцию назвали митохондриальный супернатант (МС).

Для получения митохондриальной фракции ткань гомогенизировали в растворе 0,25М маннит—0,02М трис-HCl буфере, pH 7,4 (ткань : среда = 1 : 10). Выделение ядер проводили при 800 g, а митохондрий—16 000 g. Полученную митохондриальную фракцию промывали тем же раствором. Конечный осадок суспендировали в соответствующем количестве маннит-трис буфере и использовали в опыте. Разделение митохондрий мозговой ткани проводили в центрифуге марки «Lourdes» (ротор—9RA) при 0° по следующей схеме:

Фракция M_0	
700 g, 5 мин	
осадок (фракция M_1)	супернатант
	2300 g, 5 мин
осадок (фракция M_2)	супернатант
	9000 g, 5 мин
осадок (фракция M_3)	супернатант
	20000 g, 5 мин
осадок (фракция M_4)	супернатант (выливали)

Соответствующие осадки субфракции митохондрий суспендировали в 0,25М манните и 0,02М трис-HCl буфере (pH 7,4). Чистоту митохондриальной фракции исследовали фазоконтрастным микроскопом [21, 32]. Поглощение кислорода определяли манометрическим методом Варбурга в течение 30 мин при 26°. Утилизацию глюкозы определяли по Хагедорн-Иенсену с видоизменением Дюмазера [14], молочную кислоту—цветной реакцией с р-оксидифенилом [22], а пируват и α -кетоглутарат—спектрофотометрическим методом Тарве [15]. Полученные данные рассчитаны на 1 мг белка, который определяли методом Лоури и сотр. [38].

Результаты исследования. Результаты исследования показывают, что утилизация глюкозы интенсивно протекает в безъядерном гомогенате и митохондриальном супернатанте мозга кур (табл. 1). Этот процесс в суммарной митохондриальной фракции, по сравнению с гомогенатом, уменьшается в 4,7, а с супернатантом—в 6,3 раза.

Таблица 1

Гликолитическая активность в различных субклеточных фракциях мозговой ткани кур

	Глюкоза, мг			Лактат, мкг		
	контроль	инкубированные	убыль глюкозы	контроль	инкубированные	прирост лактата
Безъядерный гомогенат	1,11 (6)*	0,97 (12)	0,14	20,3 (6)	48,9 (12)	28,6
Митохондриальная фракция	0,57 (6)	0,54 (12)	0,03	9,9 (6)	16,7 (12)	6,8
Митохондриальный супернатант	1,42 (6)	1,23 (12)	0,19	27,9 (6)	43,4 (12)	15,5

* Количество опытов.

Инкубационная смесь (1,5 мл) содержала (в молях): К—фосфатный буфер (рН 7,4)—0,1, трис-НСI буфер (рН 7,4)—0,02, глюкоза—0,3, $MgSO_4$ —0,12, АТФ-Na—0,03, НАД—0,003, НА—0,12. Митохондрии добавляли в пробу в количестве 0,5 мл, соответствующем 3—4 мг белка. Инкубация—при 26°, время—30 мин, в среде атмосферного воздуха.

Лактат интенсивно образуется в безъядерном гомогенате и митохондриальном супернатанте (табл. 1). В суммарной митохондриальной фракции прирост его, по сравнению с гомогенатом, уменьшается в 4,2, а в супернатанте—в 2,3 раза. Приведенные данные показывают, что митохондриальная фракция, выделенная из мозговой ткани кур обычным способом центрифугирования, не лишена гликолитической способности. Результаты этих опытов совпадают с литературными данными [17, 19, 20, 26, 27, 33, 34].

В прежних работах мы показали, что в безъядерном гомогенате, в суммарной митохондриальной фракции и супернатанте мозговой ткани куриного эмбриона как утилизация глюкозы, так и образование молочной кислоты в конце эмбрионального развития постепенно усиливается и достигает максимума после вылупления в постнатальный период. При сопоставлении данных в отношении гликолитической активности в мозгу куриного эмбриона и зрелых особей видно, что у кур этот процесс протекает слабее и почти соответствует тому уровню, который отмечался у эмбриона в раннем эмбриогенезе (начиная с 13-го дня инкубации). Повышение активности гликолитического процесса в конце эмбриогенеза, по-видимому, связано с потреблением больших количеств субстратов и энергетических затрат в мозгу, необходимых для создания собственной терморегуляции и сохранения постоянной температуры организма.

Количественные сдвиги кетокислот в различных компонентах клетки различны. Большое количество пирувата и α -кетоглутарата после инкубации образуется в безъядерном гомогенате и митохондриальном супернатанте (табл. 2).

Таблица 2

Интенсивность образования кетокислот в различных субклеточных фракциях мозговой ткани кур.

	Пируват, мг		α -кетоглутарат, мкг	
	контроль	инкубированные	контроль	инкубированные
Безъядерный гомогенат	0,03 (4)	3,1 (4)	0,02 (4)	0,56 (4)
Митохондриальная фракция	0 (4)	0,30 (4)	0 (4)	0,18 (4)
Митохондриальный супернатант	0,03 (4)	1,8 (4)	0,01 (4)	0,45 (4)

Инкубационная смесь приведена в табл. 1.

Инкубация при 26°, время—30 мин, в атмосферном воздухе.

В другой серии опытов была исследована интенсивность гликолиза в субфракциях митохондрий мозговой ткани кур. Необходимость этих исследований возникла в связи с тем, что ряд литературных [1, 3, 4, 16, 28, 29, 37, 45] и наших данных подтверждают биохимическую гетерогенность митохондрий центральной нервной системы. Исследования, проведенные нами [10, 11, 13], показывают, что разные фракции митохондрий, выделенные из мозговой ткани куриных эмбрионов и зрелых кур, гетерогенны и отличаются по интенсивности дыхания, эстерификации неорганического фосфата, ферментной активности, а также по оптическим свойствам.

Проведенные опыты показывают, что в различных фракциях митохондрий, выделенных из мозга кур, частично протекает процесс утилизации глюкозы и образование лактата (табл. 3). Однако в отношении

Таблица 3

Гликолитическая активность в различных фракциях митохондрий головного мозга кур

Фракции митохондрий	Глюкоза, мг			Лактат, мкг		
	контроль	инкубированные	убыль глюкозы	контроль	инкубированные	прирост лактата
M ₀	0,35*	0,30	0,05	24,7	28,7	4,0
M ₁	0,29	0,20	0,09	10,9	15,7	4,8
M ₂	0,68	0,55	0,13	24,0	28,2	4,4
M ₃	0,66	0,51	0,15	33,0	37,1	4,1
M ₄	1,60	1,44	0,16	65,9	68,8	2,9

*Средние данные 4 опытов, рассчитанные на 1 мг белка.

интенсивности этих процессов в разных фракциях заметной разницы не наблюдается. Подобная картина в различных митохондриальных субфракциях мозга наблюдается также при образовании пирувата и α -кетоглутарата (табл. 4).

Таблица 4

Интенсивность образования кетокислот в различных фракциях митохондрий головного мозга кур

Фракции митохондрий	Пируват, мкг		α -кетоглутарат, мкг	
	инкубированные	прирост пирувата	инкубированные	прирост α -кетоглутарата
M ₁	0,06*	0,05	0,05	0,01
M ₂	0,06	0,06	0,07	0,02
M ₃	0,05	0,05	0,05	0,03
M ₄	0,04	0,05	0,04	0,02

* Средние данные 4 опытов, рассчитанные на 1 мг белка.

Для сравнения интенсивность гликолиза исследовали также в различных фракциях мозговых митохондрий белых крыс (табл. 5). Митохондриальные субфракции мозга крыс выделяли тем же способом, что

Таблица 5

Гликолитическая активность в различных фракциях митохондрий головного мозга белых крыс

Фракции митохондрий	O ₂ , мк атомы	Глюкоза, мг			Лактат, мкг		
		контроль	инкубированные	убыль глюкозы	контроль	инкубированные	прирост лактата
M ₀	0,59*	0,39	0,37	0,02	16,8	17,8	1,0
M ₁	0,46	0,37	0,28	0,09	15,5	15,6	0,1
M ₂	0,99	1,08	0,82	0,26	48,2	48,3	0,1
M ₃	0,73	1,30	0,92	0,38	59,9	59,9	0
M ₄	0,48	4,28	3,78	0,50	209,8	209,9	0,1

* Средние данные 4 опытов, рассчитанные на 1 мг белка.

и у кур. Заслуживает внимания тот факт, что утилизация глюкозы здесь от M₀ до M₄ постепенно увеличивается. Этот процесс значительно медленнее протекает в суммарной митохондриальной фракции (M₀). Что касается образования лактата, то во всех выделенных субфракциях митохондрий крыс этот процесс имел одинаковый исход.

Работами Северина и сотр. [9] показано, что митохондрии грудной мышечной ткани голубя, добавленные в гиалоплазму (не содержащую митохондрий и эндоплазматический ретикулум), частично активируют гликолитический процесс. Однако авторы не связывают это влияние с гликолитическим свойством. Действительно, в контрольных опытах выяснилось, что митохондрии, промытые средой выделения, полностью лишены гликолитических способностей. Подтвердилось также, что этот эффект в условиях атмосферного воздуха и азота одинаков. Следовательно, влияние митохондрий на гликолиз не связано с системой окислительного фосфорилирования.

Исходя из этих данных, в последней серии опытов мы изучали

влияние митохондрий на гликолитическую активность в митохондриальном супернатанте. Выяснилось, что разные митохондриальные фракции мозга кур не влияют на утилизацию глюкозы в супернатанте (табл. 6); Они не влияют и на образование лактата (табл. 7).

Таблица 6

Влияние различных фракций митохондрий на утилизацию глюкозы в супернатанте мозга кур, мг

Фракции клетки	Контроль	Инкубированные
МС*	1,08; 1,42; 1,90 (1,46)**	0,97; 1,36; 1,29; 1,32; 1,18 (1,23)
M ₀	1,36; 1,42; 1,19 (1,32)	1,46; 1,53; 1,02 (1,33)
M ₀ +МС	1,36; 1,39; 1,78 (1,51)	0,84; 0,68; 1,42; 1,32; 1,59; 1,69 (1,25)
M ₁	0,95; 1,42; 1,88 (1,10)	1,07; 1,09; 1,03 (1,06)
M ₁ +МС	0,93; 1,42; 1,29 (1,21)	0,29; 1,19; 1,05; 1,05; 1,42; 1,02; 1,03; 1,06 (1,01)
M ₂	1,05; 1,51; 1,78 (1,45)	0,99; 1,65; 1,88 (1,50)
M ₂ +МС	0,97; 1,42; 1,56 (1,31)	0,81; 0,70; 1,48; 1,26; 1,42; 1,32; 1,18 (1,16)
M ₃	1,22; 1,02; 1,24 (1,16)	0,81; 1,18; 1,02 (1,00)
M ₃ +МС	1,17; 1,42; 0,81 (1,13)	0,43; 1,01; 0,84; 1,05; 1,59; 1,35 (1,04)
M ₄	0,84; 1,42; 1,65 (1,30)	1,06; 1,26; 1,48 (1,26)
M ₄ +МС	0,95; 1,42; 0,88 (1,08)	0,79; 0,61; 0,67; 0,64; 1,05; 1,90 (0,94)

* Митохондриальный супернатант.

** В скобках—средние арифметические.

Митохондриальный супернатант—2 мл (эквивалентен 350 мг ткани), митохондриальные фракции—0,3 мл (эквивалентны 300 мг ткани). Время инкубации—30 мин, температура—26°, инкубационная среда—воздух.

Таблица 7

Влияние различных фракций митохондрий на гликолитическую активность в митохондриальном супернатанте

Фракции клетки	Контроль	Инкубированные	Прирост лактата
МС	64,8; 93,2; 86,9 (81,6)	199,1; 200,7; 233,8; 229,1; 112,2; 109,0 (180,6)	99,0 8,4
M ₀	60,0; 79,0; 98,0 (79,0)	86,9; 94,8; 80,6 (87,4)	
M ₀ +МС	86,9; 86,9; 82,2 (85,3)	175,4; 184,9; 241,7; 270,2; 142,2; 131,1 (190,9)	105,6 14,3
M ₁	79,0; 80,6; 75,8 (78,4)	86,9; 104,3; 86,9 (92,7)	
M ₁ +МС	86,9; 86,9; 79,0 (84,2)	233,8; 251,2; 232,3; 232,3; 121,7; 131,1 (200,2)	116,2 17,4
M ₂	66,3; 71,1; 71,1 (69,5)	101,1; 101,1; 58,5 (86,9)	
M ₂ +МС	86,9; 88,5; 79,0 (84,4)	251,2; 260,7; 233,8; 246,5; 113,8; 109,0 (202,5)	118,1 19,5
M ₃	75,8; 71,1; 74,3 (73,7)	110,6; 93,2; 75,8 (93,2)	
M ₃ +МС	86,9; 79,0; 80,6 (82,2)	240,2; 222,8; 254,4; 246,5; 140,6; 107,4 (202,1)	119,9 15,3
M ₄	79,0; 71,1; 71,1 (73,7)	94,8; 93,2; 79,0 (89,0)	
M ₄ +МС	79,0; 75,8; 71,1 (75,3)	243,3; 262,3; 229,1; 254,4; 105,9; 109,0 (200,6)	125,3

* В скобках средние арифметические.

Количество лактата в мкг-ах. Инкубационная смесь и условия опыта приведены в предыдущей таблице.

При изучении влияния НАД, НА и АТФ на гликолитический процесс в суммарной митохондриальной фракции, выделенной из мозговой ткани

кур было выявлено, что исключение из реакционной смеси НАД снижает количество поглощенного кислорода в митохондриях в 2, АТФ—в 2,5, а НАД+АТФ—почти в 3 раза, по сравнению с контролем (табл. 8).

Таблица 8

Влияние НАД, НА и АТФ на гликолитическую активность и образования кетокислот в митохондриальной фракции головного мозга кур

Условия опыта	O ₂ , мкА	Убыль глюкозы, мг	Прирост лактата, мкг	Прирост пирувата, мкг	Прирост α-кетоглутарата, мкг
Контроль	0,46*	0,09	4,98	0,16	0,21
Без НАД	0,24	0,03	1,12	0,06	0,03
Без НА	0,18	0,02	2,64	0,07	0,05
Без АТФ	0,19	0,04	0,62	0,04	0,02
Без НАД+НА	0,20	0,05	0,50	0,03	0,03
Без НАД+АТФ	0,16	0,00	0,60	0,03	0,01

* Средние данные 4 опытов.

Отсутствие указанных веществ значительно влияет и на процесс утилизации глюкозы, образования лактата, пирувата и α-кетоглутарата. Эти результаты совпадают с данными, полученными в отношении митохондриальной фракции куриного эмбриона [12].

Таким образом, различным субклеточным фракциям мозга кур свойственна различная гликолитическая активность. Процесс гликолиза интенсивно протекает в безъядерном гомогенате и митохондриальном супернатанте, незначительно—в суммарной и субмитохондриальной фракциях. Четыре субфракции митохондрий мозговой ткани своими гликолитическими свойствами существенно не отличаются, и при добавлении к митохондриальному супернатанту не стимулируют гликолиз.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 3.II 1970 г.

Ռ. Ա. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ, Ա. Ա. ՍԻՄՈՆՅԱՆ, Ր. Բ. ԲԱԴԱԼՅԱՆ

ԳԼԻԿՈԼԻՏԻԿ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ՀԱՎԻ ՈՒՂԵՂԱՅԻՆ ՀՅՈՒՍՎԱԾԻ
ԵՆԹԱԲԶՁԱՅԻՆ ՏԱՐԲԵՐ ՖՐԱԿՑԻԱՆԵՐՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո մ

Դիֆերենցիալ ցենտրիֆուգացման եղանակով հավի ուղեղային հյուսվածքից անջատված ենթաբջջային տարրեր ֆրակցիաներն օժտված են գլիկոլիտիկ տարրեր ակտիվությամբ: Գլիկոլիզն ինտենսիվ ընթանում է ուղեղի անկորիկ հոմոգենատում և միտոքոնդրիաների վերնատվածքային հեղուկում: Գլիկոլիտիկ թույլ ակտիվությամբ օժտված է ուղեղային հյուսվածքից անջատված միտոքոնդրիաների գոմարային ֆրակցիան: Ուղեղից անջատված միտոքոնդրիաների

չորս տարբեր ֆրակցիաները գլիկոլիտիկ հատկությամբ իրարից չեն տարբերվում և միտոքոնդրիաների վերնստվածքային հեղուկին ավելացնելու դեպքում գլիկոլիզը չեն խթանում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Атабегова Н. Г. Энергетический обмен головного мозга при охлаждении и согревании. Автореферат канд. диссертации. Ростов-на Дону, 1966.
2. Григорьева В. А., Медовар Е. Н. и Щукина Л. В. Укр. биохим. журн., 1, 70, 1966.
3. Монахов Н. К. Биохимия, 29, 5, 955, 1964.
4. Монахов Н. К. Молекулярная биология, 1, 114, 1967.
5. Нейфах С. А. В кн.: Механизм и кинетика ферментативного катализа, 272, М., 1964.
6. Пинус Е. А. и Сисакян Н. М. Биохимия, 6, 1090, 1961.
7. Разумовская (Беляева) Н. И. Биохимия, 3, 499, 1965.
8. Рушак М., Мацейова Е., Рушак Д. и Мрена Э. Укр. биохим. журн., 4, 584, 1964.
9. Северин С. Е., Мишукова Е. А., Абдалла М. О. и Ткаль В. В. Вопросы мед. химии, 14, 2, 205, 1968.
10. Симонян А. А., Степанян Р. А. Мат. третьей респ. научн. конф. молодых научных работников Армении, посвященной 100-летию со дня рождения В. И. Ленина. Изд. АН АрмССР, 226, 1970.
11. Симонян А. А. Там же, стр. 225.
12. Симонян А. А., Степанян Р. А. и Бадалян Р. Б. Гликолитический процесс в структурных элементах мозговых клеток куриного эмбриона в эмбриогенезе. Вопросы биохимии мозга. Изд. АН АрмССР, 6, 1970 (в печати).
13. Симонян А. А., Степанян Р. А. О функциональной гетерогенности митохондрий мозговой ткани. Вопросы биохимии мозга. Изд. АН АрмССР, 6, 1970 (в печати).
14. Смирнова Л. Г. и др. Практикум по биохимии. Медгиз, М., 1957.
15. Тарве У. С. Третья Всесоюзная конф. по биохимии нервной системы, Ереван, 271, 1963.
16. Хесин Р. Б., Петрошкяйте С. К. и др. Биохимия, 22, 501, 1957.
17. Abood L. G., Brunngraber E. and Taylor M. J. Biol. Chem., 234, 1307, 1959.
18. Aldridge W. N. Biochem. J., 67, 423, 1957.
19. Balazs R. Biochem. J., 72, 561, 1959.
20. Balazs R. and Lagnado J. R. J. Neurochem., 5, 1, 1960.
21. Barer R. In: Physical techniques in biological research (G. Oster and A. W. Pollister eds). Academic Press, N.-Y., 3, 30, 1956.
22. Barker J. B. and Summerson N. H. J. biol. Chem., 138, 535, 1941.
23. Beattie D. S., Sloan H. R. and Basford R. E. Feder. Proc., 21, 154, 1962.
24. Beattie D. S., Sloan H. R. and Basford R. E. J. Cell Biol., 19, 309, 1963.
25. Brunngraber E. G., Aguilar V. and Occomy W. G. J. Neurochem., 10, 433, 1963.
26. Brunngraber E. G. and Abood L. G. J. Biol. Chem., 235, 1847, 1960.
27. Cohen H. P. Arch. Biochem. Biophys., 92, 449, 1961.
28. D'Amelio V., Mutolo V. and Barbarino A. Exptl. Cell Res., 29, 1, 1963.
29. De Duve C., Berthet J. and Beafay H. Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry, 9, 325. Pergamon Press, L., 1959.
30. De Robertis E., De Iraldi A. P., Arnaiz De Lores G. R. and Salganicoff L. J. Neurochem., 9, 23, 1962.
31. Fain J. N. and Wilhelmi A. E. Ibid, 64, 508, 1962.
32. Frederic J. Ann., N. Y. Acad. Sci., 58, 1246, 1954.

33. Gallagher C. H., Judah J. D. and Ress K. R. *Biochem. J.*, 62, 436, 1956.
34. Hesselbach L. M. and du Buy H. G. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 83, 62, 1953.
35. Jones V. D., Norris J. L. and Landon E. J. *Biochim. biophys. Acta*, 71, 277, 1963.
36. Johnsson M. K. *Biochem. J.*, 77, 610, 1960.
37. Kuff E. L. and Schneider W. C. *J. Biol. Chem.*, 206, 677, 1954.
38. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
39. Margreth A., Muscatello U. and Andersson-Cedergren E. *Exp-Cell Res.*, 32, 484, 1963.
40. Margreth A. *Biochim. biophys. Acta*, 77, 337, 1963.
41. Petrushka E. and Gluditta A. J. *Biochem. Biophys. Cytol.*, 6, 129, 1959.
42. Potter V. R. and Elvehjem C. A. *J. Biol. Chem.*, 114, 495, 1936.
43. Ruščák M., Macejova E. and Ruščáková D. *Phystol. bohemoslov*, 13, 1964.
44. Tanaka S. and Abood L. G. *J. Neurochem.*, 10, 571, 1963.
45. Thompson J. F. *Analyt. Chem.*, 31, 836, 1939.