

ОЦІНКА АНТИОКСИДАНТНОЇ ТА АНТИРАДИКАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ МУЛЬТИНУТРИЄНТНОГО ВІТАМІННО-МІНЕРАЛЬНОГО КОМПЛЕКСУ РЕЛАЙВ БАЛАНС

Вільно радикальні реакції є невід'ємною частиною метаболізму за умов фізіологічної норми; дані реакції лежать в основі низки життєво важливих процесів, зокрема таких, яких знешкодження чужорідних сполук, імунна відповідь, акумуляція і біотрансформація енергії; вільні радикали виконують сигнальну та регуляторну функції; за їх участі контролюються найважливіші гомеостатичні фізико-хімічні параметри клітини: в'язкість, вибіркова проникність, цілісність клітинних мембран [1].

Разом з тим, надмірна активація вільно радикальних реакцій на тлі порушення/виснаження функціонального резерву антиоксидантної системи захисту організму призводить до накопичення надлишку активних кисневих метаболітів та розвитку оксидативного стресу – стану, який є патогенетичною ланкою багатьох соціально-значимих захворювань (цукровий діабет, ішемічна хвороба серця, атеросклероз, хвороба Альцгеймера) [2]. Доведено, що оксидативний стрес є не лише наслідком патологічного процесу, а часто слугує одним з тригерних механізмів, що лежать в основі розвитку захворювання.

Деструктивна дія вільних радикалів (активних форм кисню та азоту) пов'язана з наявністю вільного неспареного електрону, що обумовлює їх високу реакційну здатність та забезпечує високу швидкість перебігу реакцій за їх участі. Опосередковане вільними радикалами перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) обумовлює порушення цілісності клітинних мембран. Деградація ліпідів мембран веде до зростання текучості мембрани клітини та збільшує її проникність до іонів, що у цілому негативно впливає на клітинний гомеостаз. Зростання концентрації вільних радикалів призводить до пошкодження структури ядерної та мітохондріальної ДНК, білкових молекул, що у свою чергу є причиною злоякісної трансформації клітин та передчасного старіння організму.

Підтримка антиоксидантного статусу організму за рахунок систематичного вживання продуктів чи біологічно активних добавок, компоненти яких виявляють антиоксидантну активність, може розглядатися як етап превентивної стратегії профілактики розвитку станів, асоційованих з оксидативним стресом. Застосування препаратів комплексної дії, що знижують ймовірність утворення

вільних радикалів дозволяє здійснювати корекцію метаболічних та функціональних змін на рівні окремих клітинних структур, попереджуючи таким чином розвиток органних та системних порушень.

Метою дослідження було оцінити антиоксидантну та антирадикальну активність комплексів «Релайв баланс Мікс» та «Релайв баланс Про».

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Приготування спиртового та водного розчину препаратів

Наважки досліджуваних препаратів вагою 25 мг розчиняли у 2,5 мл 20% етилового спирту чи дистильованої води. Для кращого розчинення проби поміщали на 15 хв на автоматичний шейкер, після чого центрифугували впродовж 10 хв при 1500 г. Визначення цільових активностей проводили у надосадовій рідині.

Всі реактиви, використані для дослідження, мали кваліфікацію «хч» або «чда».

Визначення загальної антиоксидантної активності

Загальну антиоксидантну активність оцінювали за відновленням стабільної сполуки 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразу (ДФПГ) [3]. Реакцію проводили в лунках 96-лункового мікропланшету. Зразок водного чи спиртового розчину досліджуваних комплексів змішували з 0,15 мМ розчином ДФПГ, який готували, розчиняючи реактив у 96% етиловому спирті. Проби залишали у темряві при кімнатній температурі на 30 хв, після чого вимірювали оптичну щільність проб на мікропланшетному спектрофотометрі (BioTek Instruments, BioTek, USA) при довжині хвилі 517 нм. Бланком для кожного тестового зразка був розчин відповідного зразка у 96% етиловому спирті. Контрольна проба містила суміш спиртового розчину ДФПГ з відповідним об'ємом розчинника, замість тестового зразка. Кінцевий об'єм інкубаційного середовища був однаковий для всіх проб і становив 0,25 мл.

Загальну антиоксидантну активність виражали у відсотках, використовуючи наступну формулу:

$$\% = (A_{\text{контроль}} - A_{\text{зразок}}) / A_{\text{контроль}} \times 100, \text{ де}$$

$A_{\text{контроль}}$ – адсорбція контрольної проби,

$A_{\text{зразок}}$ – адсорбція проби, що містила зразок спиртового чи водного розчину досліджуваного комплексу.

Перед проведенням розрахунку від значень $A_{\text{контроль}}$ та $A_{\text{зразок}}$ віднімали значення відповідних бланків. Виміри проводили у трьох кратній повторності.

Оцінка редукуючої здатності

Редукуючу здатність оцінювали відповідно до методу [4]. Зразок водного чи спиртового розчину досліджуваних комплексів змішували з 0,2 М натрій-фосфатним буфером, рН 6,6 та 0,05 % розчином калій ферріціаніду. Бланкова проба замість калій ферріціаніду містила відповідний об'єм дистильованої води. Контрольна проба містила суміш калій ферріціаніду та 0,2 М натрій-фосфатний буфер, рН 6,6. Кінцевий об'єм інкубаційного середовища був однаковий для всіх проб і становив 1 мл. Проби поміщали у водяну баню при 50°C на 20 хв, після чого додавали 5% трихлороцтову кислоту. Після центрифугування, надосадову рідину змішували з рівним об'ємом дистильованої води і додавали 0,1% розчин сульфату заліза (III). Суміш залишали на 10 хв, після чого вимірювали оптичну щільність проб на мікропланшетному спектрофотометрі (BioTek Instruments, BioTek, USA) при довжині хвилі 700 нм.

Редукуючу здатність розраховували за формулою:

$$\% = (A_{\text{зразок}} - A_{\text{контроль}}) / A_{\text{зразок}} \times 100, \text{ де}$$

$A_{\text{контроль}}$ – адсорбція контрольної проби,

$A_{\text{зразок}}$ – адсорбція проби, що містила зразок спиртового чи водного розчину досліджуваного комплексу.

Перед проведенням розрахунку від значень $A_{\text{контроль}}$ та $A_{\text{зразок}}$ віднімали значення відповідних бланків. Виміри проводили у трьох кратній повторності.

Оцінка здатності хелатувати іони Fe^{2+}

Визначення проводили відповідно до методу [5]. Зразок водного чи спиртового розчину досліджуваних комплексів змішували з 0,2 мМ розчином сульфату заліза та 0,01% перекисом водню. Проби залишали при кімнатній температурі на 10 хв, після чого додавали 0,2 мМ розчин фенантроліну. Бланкова проба замість сульфату заліза та перекису водню містила відповідний об'єм дистильованої води. Контрольна проба містила суміш 0,2 мМ розчину сульфату заліза та фенантроліну. Негативним контролем слугувала проба, що містила всі

складові за виключення досліджуваних зразків. Кінцевий об'єм інкубаційного середовища був однаковий для всіх проб і становив 0,25 мл. Оптичну щільність проб вимірювали на мікропланшетному спектрофотометрі (BioTek Instruments, BioTek, USA) при довжині хвилі 510 нм.

Розрахунок хелатуючої активності проводили за формулою:

$$\% = (A_{\text{зразок}} - A_{\text{негативний контроль}}) / A_{\text{контроль}} - A_{\text{негативний контроль}} \times 100, \text{ де}$$

$A_{\text{контроль}}$ – адсорбція контрольної проби,

$A_{\text{негативний контроль}}$ – адсорбція проби, що містила всі складові за виключення досліджуваних зразків,

$A_{\text{зразок}}$ – адсорбція проби, що містила зразок спиртового чи водного розчину досліджуваного комплексу.

Перед проведенням розрахунку від значень $A_{\text{контроль}}$ та $A_{\text{зразок}}$ віднімали значення відповідних бланків. Виміри проводили у трьох кратній повторності.

Оцінка здатності знешкоджувати перекис водню

Здатність знешкоджувати перекис водню оцінювали відповідно до методу [6]. Реакцію проводили в лунках 96-лункового мікропланшету. Зразок водного чи спиртового розчину досліджуваних комплексів змішували з 5 мМ розчином перекису водню, який розводили до необхідної концентрації за допомогою 0,1 М натрій-фосфатного буферу, рН 7,4. Проби залишали при кімнатній температурі на 10 хв, після чого додавали 4% розчин амонію молібденовокислого. Бланкова проба замість перекису водню містила відповідний об'єм дистильованої води. Контрольна проба містила суміш перекису водню та амонію молібденовокислого. Кінцевий об'єм інкубаційного середовища був однаковий для всіх проб і становив 0,3 мл. Оптичну щільність проб вимірювали на мікропланшетному спектрофотометрі (BioTek Instruments, BioTek, USA) при довжині хвилі 410 нм.

Здатність знешкоджувати перекис водню виражали у відсотках і розраховували за формулою:

$$\% = (A_{\text{контроль}} - A_{\text{зразок}}) / A_{\text{контроль}} \times 100, \text{ де}$$

$A_{\text{контроль}}$ – адсорбція контрольної проби,

$A_{\text{зразок}}$ – адсорбція проби, що містила зразок спиртового чи водного розчину досліджуваного комплексу.

Перед проведенням розрахунку від значень $A_{\text{контроль}}$ та $A_{\text{зразок}}$ віднімали значення відповідних бланків. Виміри проводили у трьох кратній повторності.

Оцінка здатності знешкоджувати супероксидний аніон-радикал

Метод ґрунтується на реакції відновлення нітросинього тетразолію (НСТ) за участі супероксидних аніон-радикалів, що утворюється при взаємодії НАДН⁺ та фенозинмоносульфату (ФМС) [7]. Реакцію проводили в лунках 96-лункового мікропланшету. До зразків водного чи спиртового розчину досліджуваних комплексів послідовно додавали 80 мкМ НАДН⁺ та 20 мкМ ФМС. Проби залишали на 5 хв при кімнатній температурі, після чого вносили 50 мкМ НСТ. Проби залишали в темряві при кімнатній температурі на 5 хв, після чого вимірювали оптичну щільність проб на мікропланшетному спектрофотометрі (BioTek Instruments, BioTek, USA) при довжині хвилі 560 нм. Кінцевий об'єм інкубаційного середовища був однаковий для всіх проб і становив 0,25 мл. Всі реактиви розчиняли у 50 мМ трис-НСІ буфері, рН 7,4. Бланкова проба містила досліджуваний зразок та 50 мкМ НСТ. Контрольна проба містила всі компоненти за виключенням досліджуваного зразка. Виміри проводили у трьох кратній повторності.

Відсоток інгібування розраховували за формулою:

$$\% = (A_{\text{контроль}} - A_{\text{зразок}}) / A_{\text{контроль}} \times 100, \text{ де}$$

$A_{\text{контроль}}$ – адсорбція контрольної проби,

$A_{\text{зразок}}$ – адсорбція проби, що містила зразок спиртового чи водного розчину досліджуваного комплексу.

Перед проведенням розрахунку від значень $A_{\text{контроль}}$ та $A_{\text{зразок}}$ віднімали значення відповідних бланків.

Оцінка здатності знешкоджувати NO радикал

Метод ґрунтується на визначенні оксиду азоту, який утворюється при розкладанні водних розчинів нітропрусиду натрію за рН 7,2, у реакції з реактивом Грісса [8].

Зразок водного чи спиртового розчину досліджуваних комплексів змішували з 10 мМ розчином нітропрусиду натрію, який розчиняли у 0,1 М натрій-

фосфатному буфері, рН 7,4. Бланком для кожного тестового зразка був розчин відповідного зразка у 0,1М Na-фосфатному буфері, рН 7,4. Контрольна проба містила суміш розчину нітропрусиду натрію з відповідним об'ємом розчинника, замість тестового зразка. Кінцевий об'єм інкубаційного середовища був однаковий для всіх проб і становив 0,3 мл. Проби залишали у темряві при кімнатній температурі на 120 хв, після чого від них відбирали аліквоту об'ємом 0,1 мл і переносили в лунки 96-лункового мікропланшету. До всіх проб, включаючи бланки та контроль, додавали 5% водний розчин реактиву Грісса. Проби залишали в темряві при кімнатній температурі на 30 хв, після чого вимірювали оптичну щільність проб на мікропланшетному спектрофотометрі (BioTek Instruments, BioTek, USA) при довжині хвилі 546 нм.

Здатність знешкоджувати NO радикал виражали у відсотках уловлення NO і розраховували за формулою:

$$\% = (A_{\text{контроль}} - A_{\text{зразок}}) / A_{\text{контроль}} \times 100, \text{ де}$$

$A_{\text{контроль}}$ – адсорбція контрольної проби,

$A_{\text{зразок}}$ – адсорбція проби, що містила зразок спиртового чи водного розчину досліджуваного комплексу.

Перед проведенням розрахунку від значень $A_{\text{контроль}}$ та $A_{\text{зразок}}$ віднімали значення відповідних бланків. Виміри проводили у трьох кратній повторності.

Визначення концентрації білка

Концентрацію білка визначали за методом Бредфорд [9]. Метод ґрунтується на здатності залишків аргініну та гідрофобних амінокислот у складі білкових молекул зв'язуватись з барвником кумасі діамантовий синій, що призводить до зміни спектру поглинання барвника з 465 нм на 595 нм. Досліджуваний зразок змішували з реактивом Бредфорд. Оптичну щільність проб вимірювали на мікропланшетному спектрофотометрі (BioTek Instruments, BioTek, USA) при довжині хвилі 595 нм. Концентрацію білка визначали за калібрувальним графіком, який будували з використанням розчину сироваткового альбуміну та виражали у мг/мл.

Визначення вмісту триптофану

Вміст триптофану визначали згідно з методом [10]. До 100 мг досліджуваних зразків додавали 0,05 М NaOH та декілька крапель NaCN. Проби залишали на 12 год при 70°C, після чого розводили дистильованою водою у співвідношенні 1:1. Аліквоту проб змішували з рівним об'ємом 0,1 М KOH і CCl₄ та залишали на 10 хв на шейкері з невеликою амплітудою коливання. Надосадову рідину, одержану після центрифугування проб при 1500 г впродовж 10 хв, розділяли на дві проби – дослідну та бланкову. До дослідної проби додавали розчин 5% диметиламінобензальдегіду, до бланкової проби – відповідний об'єм дистильованої води. До обох проб додавали концентровану соляну кислоту та 0,2% NaNO₂. Через 5 хв інкубації вимірювали оптичну щільність проб на мікропланшетному спектрофотометрі (BioTek Instruments, BioTek, USA) при довжині хвилі 590 нм.

Вміст триптофану розраховували відповідно до формули і виражали у мкг/г:

$$\text{мкг/г} = (200 \times A_{\text{зразок}}) / A_{\text{стандарт}} \times B, \text{ де}$$

$A_{\text{стандарт}}$ – адсорбція проби з відомим вмістом триптофану

$A_{\text{зразок}}$ – адсорбція досліджуваної проби,

B – вага досліджуваного зразка, г.

Перед проведенням розрахунку від значень $A_{\text{зразок}}$ віднімали значення відповідних бланків. Виміри проводили у трьох кратній повторності.

Статистична обробка

Статистичну обробку отриманих результатів проводили використанням комп'ютерної програми «Microsoft Excel 2016».

ОДЕРЖАНІ РЕЗУЛЬТАТИ

Оскільки обидва комплекси є багатокомпонентними та поліфункціональними за складом, для визначення антиоксидантної активності зразків було використано ряд методик, які дозволяють комплексно оцінити різні аспекти прояву активності.

Перш за все було визначено загальну антиоксидантну активність, яка є інтегральним показником, що дозволяє попередньо визначити наявність антиоксидантного потенціалу. Відповідно до одержаних результатів (табл. 1 та табл. 2), загальна антиоксидантна активність знаходилась у межах 46% і 68% відповідно для спиртового та водного розчинів комплексу «Релайв баланс Про» та 29% і 41% для спиртового та водного розчинів «Релайв баланс Мікс». У цілому загальна антиоксидантна активність водних розчинів обох комплексів була на 47% та 41% вищою у порівнянні з такою спиртових розчинів.

Інформативним тестом оцінки антиоксидантної активності сполук є їх редукуюча здатність, оскільки саме цей показник дозволяє зробити висновок про антирадикальні властивості. Як бачимо з даних таблиць 1 та 2, редукуюча здатність комплексів «Релайв баланс Про» та «Релайв баланс Мікс» знаходилась у межах 65-66% для препарату «Релайв баланс Про» та 27-30% для препарату «Релайв баланс Мікс».

Таблиця 1. Антиоксидантна та антирадикальна активність комплексу «Релайв баланс Про»

	«Релайв баланс Про»	
	Спиртовий розчин	Водний розчин
Загальна антиоксидантна активність, %	46±4	68±8
Редукуюча здатність, %	66±6	65±6
Fe ⁺² -хелатуюча активність, %	58±5	40±4
Здатність знешкоджувати перекис водню, %	12±2	7±2
Здатність знешкоджувати супероксидний аніон-радикал, %	8±2	10±2
Здатність уловлювати NO, %	0,9±0,05	Не виявлено

Підтримання належного метаболічного статусу організму не можливе без участі металів змінної валентності, які входять до складу низки клітинних білків, білків плазми крові та необхідні для прояву ферментативної активності

металозалежних ферментів. Проте при порушенні збалансованості перебігу вільно радикальних реакцій іони металів змінної валентності можуть стати вагомим фактором, що провокує зростання концентрації активних кисневих метаболітів та гідроперекисів.

З цих позицій, речовини, що здатні попереджувати включення металів у реакції генерування вільних радикалів є особливо привабливими, так як дозволяють підтримувати рівень радикалів у межах фізіологічної норми. Тому надалі було визначено здатність комплексів «Релайв баланс Про» та «Релайв баланс Мікс» хелатувати іони двовалентних металів, зокрема заліза, оскільки саме цей метал, вступаючи у реакції Фентона та Осипова, призводить до утворення гідроксильних радикалів. Незважаючи на недовговічність, гідроксильні радикали належить до найбільш агресивних кисневих метаболітів, які здатні окиснювати білки, нуклеїнові кислоти та ліпіди, обумовлюючи порушення детермінованих властивостей біологічних молекул.

Fe²⁺-хелатуюча активність комплексу «Релайв баланс Про» складала 58% та 40%, відповідно для спиртового та водного розчинів, у той час як препарат «Релайв баланс Мікс» виявляв хелатуючу активність на рівні 14% та 11%.

Згідно одержаних результатів, для комплексів «Релайв баланс Про» та «Релайв баланс Мікс» властива також здатність знешкоджувати перекис водню, причому спиртовий розчин «Релайв баланс Про» виявився найбільш ефективним у цьому відношенні (12%). Здатність препарату «Релайв баланс Мікс» знешкоджувати перекис водню була дещо нижчою і знаходилася у межах 4%.

Таблиця 2. Антиоксидантна та антирадикальна активність комплексу «Релайв баланс Мікс»

	«Релайв баланс Мікс»	
	Спиртовий розчин	Водний розчин
Загальна антиоксидантна активність, %	29±3	41±4
Редукуюча здатність, %	30±3	27±3
Fe ²⁺ -хелатуюча активність, %	14±2	11±2
Здатність знешкоджувати перекис водню, %	3±0,2	4±0,2
Здатність знешкоджувати супероксидний аніон-радикал, %	4±0,3	5±0,3
Здатність уловлювати NO, %	Не виявлено	Не виявлено

На відміну від інших активних кисневих метаболітів, перекис водню відносно інертна та стабільна сполука, що дозволяє їй дифундувати на значні відстані від місця утворення, сприяючи у такий спосіб генералізації оксидативного стресу. Адже за умов порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги перекис водню є потенційним джерелом для утворення більш реакційноздатних гідроксильного радикалу та гіпохлорит-аніону – сполук с високим окисним потенціалом, які викликають необоротну модифікацію молекул, індукують процеси перекисного окиснення ліпід, у тому числі ліпідів, що входять до складу мембран.

Виявлена нами здатність досліджуваних препаратів хелатувати іони Fe^{2+} та знижувати вміст перекису водню свідчить про їх потенційну ефективність щодо попередження утворення у тканинах та біологічних рідинах організму гідроксильних радикалів. В організмі не існує спеціальних ферментних систем інактивації гідроксильних радикалів, тому препарати, що здатні безпосередньо чи опосередковано впливати на рівень цих радикалів є перспективним з позицій їх застосування для попередження активізації вільно радикальних реакцій, особливо за умов гіпоксії та подальшої реоксигенації.

Також було оцінено здатність препаратів знешкоджувати супероксидний аніон-радикал, який є потенційним джерелом більш реакційноздатних форм активних кисневих метаболітів. Окрім того, супероксидний аніон-радикал здатен реагувати з оксидом азоту (II) з утворенням пероксинітриду. Гіперпродукція останнього викликає розвиток “нітрозуючого стресу”, який є однією з важливих патогенетичних ланок оксидативного стресу.

Результати проведених досліджень виявили здатність препаратів знижувати вміст супероксидних радикалів. Цей показник становив 8% і 10%, відповідно для спиртового і водного розчинів «Релайв баланс Про» та знаходився у межах 5% для розчинів «Релайв баланс Мікс» .

Також було оцінено здатність препаратів уловлювати оксид азоту, проте жоден з досліджуваних комплексів не виявив здатності знижувати вміст оксиду азоту.

Проведені дослідження виявили наявність у досліджуваних препаратів «Релайв баланс Мікс» і «Релайв баланс Про» антиоксидантної та антирадикальної активності. У цілому можна констатувати, що дія обох препаратів є комплексною та спрямованою як безпосередньо на знешкодження радикалів, у тому числі, супероксидного аніон-радикалу, так і на попередження їх утворення за рахунок зниження вмісту перекису водню та хелатування металів змінної валентності.

Оскільки обидва досліджувані препарати не належать до сертифікованих антиоксидантних засобів, а є мультинутрієнтами комплексної дії, що спрямовані на покращення роботи імунної системи, наявність антиоксидантної активності є додатковим аргументом на користь їх використання для підтримки гомеостазу за умов патологічних та/чи екстремальних навантажень на організм.

Результати визначення загальної концентрації білка та вмісту триптофану у досліджуваних комплексах наведено у таблиці 3.

Таблиця 3. Загальна концентрація білка та вміст триптофану у комплексах «Релайв баланс Про» та «Релайв баланс Мікс»

	«Релайв баланс Про»		«Релайв баланс Мікс»	
	Спиртовий розчин	Водний розчин	Спиртовий розчин	Водний розчин
Концентрація білка, мг/мл	0,25±0,03	0,43±0,03	0,15±0,005	0,1±0,005
Вміст триптофану, мкг/г	190±7	200±10	5,5±0,25	5,0±0,25

ВИСНОВКИ

1. Виявлено наявність у препаратів «Релайв баланс Мікс» і «Релайв баланс Про» загальної антиоксидантної та редукуючої активності.
2. Встановлено здатність препаратів хелатувати іони змінної валентності, зокрема заліза.
3. Препарати виявляли здатність до знешкодження перекису водню та супероксидного аніон-радикалу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Dröge, W. 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev.* 82, 47–95.
2. Chandrasekaran, A., Idelchik, MDPS., Melendez, J.A. 2017. Redox control of senescence and age-related disease. *Redox Biol.* 11, 91–102.
3. Manzocco, L., Anese, M., Nicoli, M.C., 1998. Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing. *Lebens-mittel-Wissenschaft Und-Technologie* 31 (7–8), 694–698).
4. Jayaprakash, G.K., Singh, R.P., Sakariah, K.K., 2001. Antioxidant activity of grape seed extracts on peroxidation models in-vitro. *J. Agric. Food Chem.* 55, 1018–1022.
5. Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.* 269, 337–341.
6. Ruch, R.J., Cheng, S.J., Klaunig, J.E., 1989. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogen* 10, 1003–1008.
7. Chakraborty, G. 2009. Free radical scavenging activity of *Aesculus indica* leaves. *International Journal of PharmTech Research.* 1(3), 524-526.
8. Ghafourifar, P., Cadenas, E., 2005. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 190–195.
9. Bradford, M.M., 1978. A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding. *Analytical Biochemistry.* 86, 193–200.
10. Lombard, J.H., De Lange, D.J., 1965. The Chemical Determination of Tryptophan in Foods and Mixed Diets. *Analytical. Biochemistry.* 10, 260-265.