

ОЦІНКА ПРОТЕЇНСИНТЕЗУЮЧОЇ ФУНКЦІЇ ПЕЧІНКИ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГЕПАТИТУ

В. А. ГРИЩЕНКО¹, В. А. ТОМЧУК¹, О. М. ЛИТВИНЕНКО¹,
В. О. ЧЕРНИШЕНКО^{2,3}, В. І. ГРИШУК², Т. М. ПЛАТОНОВА²

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ;

²Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;

³Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: dimokmpx@bigmir.net

Протеїнсинтезуючу функцію печінки оцінювали за вмістом протромбіну та його неактивної форми PIVKA-протромбіну, накопичення якого є маркером порушення функціонального стану печінки. Розроблені діагностичні тести дозволяють оцінити ефективність дії стандартного препарату «Есенціале-форте» та новоствореної ліпосомної форми БАД FLP-MD, виготовленої на основі фосфоліпідів різного походження.

Ключові слова: токсичний гепатит, PIVK-протромбін, діагностика.

Негативна дія токсичних речовин на печінку спричинює широкий спектр патологічних змін на різних рівнях її організації [1, 2]. Зважаючи на те, що при захворюваннях печінки спостерігається пошкодження мембран гепатоцитів, а також на вагому роль у патогенезі процесів пероксидного окислення ліпідів, важливим є призначення терапії, що має регенеративну дію на структуру та функції клітинних мембран і забезпечує гальмування процесів деструкції клітин. Засобами такої спрямованої дії є екзогенні фосфоліпіди з високим вмістом поліненасичених жирних кислот, які здатні відновлювати структуру та функції клітинних мембран, а також модулювати ензимну відповідь, що добре вивчено на прикладі препарату «Есенціале-форте» [3, 4]. Актуальною проблемою залишається розробка лабораторних діагностичних тестів, які б дозволяли швидко і точно визначати ефективність нових препаратів, у тому числі й розробленої нами на основі фосфоліпідів молока біологічно активної добавки (БАД) FLP-MD [5–7].

Активність системи гемостазу прямо пов'язана із функціональним станом печінки. Гепатоцити є основним місцем синтезу протеїнів системи зсідання крові та плазміногену — основного проензиму системи фібринолізу. Під час захворювань печінки знижується інтенсивність не тільки синтезу вітамін К-залежних протеїнів, але й порушується пост-трансляційне карбоксилювання залишків глутамінової кислоти Гл-домену факторів зсідання крові II, VII, IX, X,

протеїнів C, S і Z. Такі некарбоксильовані форми вітамін К-залежних протеїнів називаються PIVKA-протеїнами (синтезуються за відсутності вітаміну К). Вони не утворюють ензимні комплекси на поверхні ліпідного бішару мембран у присутності іонів кальцію та втрачають здатність виконувати відповідні функції в системі зсідання крові. Проте, дослідження вмісту вітамін К-залежних протеїнів у плазмі крові з використанням імунологічних тестів свідчать про відсутність кількісних змін, тобто ці тести в такому разі не є інформативними.

Водночас накопичення функціонально неактивних форм вітамін К-залежних протеїнів внаслідок розвитку патології печінки призводить до зниження прокоагулянтного потенціалу системи зсідання крові [8–11]. Тому визначення у плазмі крові функціонально неактивних форм протромбіну (PIVKA-протромбін) як маркера порушення функцій гепатоцитів є необхідною умовою своєчасного застосування лікувальних засобів щодо усунення гепатопатології. У цьому разі, контроль за коригувальною здатністю лікувальних препаратів базується на визначенні співвідношення між функціонально активними та неактивними формами протромбіну у плазмі крові.

Отже, метою нашої роботи було визначення індикаторних показників у системі гемостазу для контролю за ступенем відновлення протеїнсинтезуючої функції печінки та ефективністю лікувальних препаратів при токсичному гепатиті.

Матеріали і методи

Для проведення експериментальних досліджень використовували білих лабораторних щурів-самців тримісячного віку із середньою масою тіла 200–220 г. З них формували три дослідні групи та одну контрольну (по двадцять тварин у кожній). Перед початком експерименту усі тварини були на карантині впродовж двох тижнів. У цей час проводили моніторинг маси тіла піддослідних тварин. Тривалість дослідів становила 65 діб.

Медикаментозну форму токсичного гепатиту у тварин викликали за розробленою нами методикою шляхом перорального введення нестероїдного протизапального препарату «Диклофенак» (таблетки ВАТ Хімфармзавод «Червона зірка», Харків) у дозі 12,5 мг/кг 1 раз на добу впродовж 2 тижнів [12]. Спостерігали за змінами загального стану тварин, наявністю симптомів інтоксикації. Стійкі та виражені клінічні ознаки захворювання починали проявлятися в щурів вже на 7-у добу введення препарату та характеризувалися загальним пригніченням стану, зниженням апетиту, зменшенням маси тіла на 12 г у середньому на групу, тьмяним шерстним покривом, зниженням еластичності шкіри, болючістю і тимпанічністю живота, рідким неприємного запаху калом із рештками неперетравленого корму.

Надалі щурам 2-ої дослідної групи перорально вводили препарат «Есенціале-форте» (A. Nattermann & Cie. GmbH, Німеччина) у дозі 7,1 мг/кг. Тваринам 3-ої дослідної групи перорально вводили БАД FLP-MD (ліпосомальна форма, 1%-й розчин) у дозі 13,5 мг/кг. БАД FLP-MD — це суміш різних класів ФЛ (80% фосфатидилхоліну, сфінгомієліну, фосфатидилетаноламіну), ненасичених жирних кислот (лінолева, ліноленова, олеїнова) та природних антиоксидантів — вітамінів (α -токоферолу і ретинолу ацетату). Лікування проводили впродовж 50 діб.

До 1-ої групи віднесено тварин, які зазнавали самореабілітації (без лікування). До контрольної групи входили інтактні тварини, яких утримували на стандартному раціоні віварію з пероральним введенням їм еквівалентної кількості 0,15 М розчину натрію хлориду.

Показники коагуляційної системи досліджували у плазмі аортальної крові, яку збирали у пробірки з додаванням стабілізатора (3,8% розчин натрію цитрату), потім центрифугували при 1400 g впродовж 20 хв [13].

Для визначення вмісту фібриногену до плазми крові щурів додавали рівний об'єм 16%-го розчину натрію сульфату [14]. Одержаний осад розчиняли в 0,15 М розчині натрію хлориду. Концентрацію розчину визначали спектофотометрично при довжині хвилі 280 нм на спектрофотометрі СФ-2000 (ОКБ, Спектр, Росія). Коефіцієнт молярної екстинкції фібриногену — $E_{280, 1\%, 1 \text{ см}}$ 15,06. Вміст фібриногену у плазмі крові щурів контрольної групи приймали за 100%.

Для визначення вмісту плазміногену у плазмі крові щурів використовували метод афінної хроматографії на Lys-сефарозі [15]. Всі операції проводили при температурі +4 °С. Плазму крові щурів розводили у 2 рази 0,1 М фосфатним буфером рН 7,4, додавали контрикал (10 тис IU/л), PMSF (2 мкМ/мл) і наносили на колонку (0,7×2,0 см). Відмивання від неспецифічно зв'язаних протеїнів проводили 0,1 М фосфатним буфером рН 7,4 з 0,25 М розчином натрію хлориду. Елюювали плазміноген 0,2 М 6-аміногексановою кислотою в 0,05 М фосфатному буфері рН 7,4 зі швидкістю 50 мл/год. Коефіцієнт молярної екстинкції плазміногену $E_{280, 1\%, 1 \text{ см}}$ — 17,0. Вміст плазміногену в плазмі крові щурів контрольної групи приймали за 100%.

Амідолітичну активність тромбіну (здатність гідролізувати трипептидні субстрати X-X-X-pNa) визначали відповідно до інструкції «Ренам» (Росія). Для цього в лунку планшети для культури клітин вносили 10 мкл досліджуваної плазми крові щура, 10 мкл 0,025 М розчину кальцію хлориду, 10 мкл активатора протромбіну (екамуліну 35 мкг/мл або тромбопластину 60 мкл/мл), 25 мкл 3 мМ розчину хромогенного субстрату та 0,05 М трис-НСІ буфер, рН 7,4, що містив 0,13 М натрію хлориду. Загальний об'єм інкубаційного середовища — 250 мкл, інкубували 5 хв при температурі 37 °С. Розчин тромбопластину готували за інструкцією фірми Ренам (Москва).

Вивільнення п-нітроаніліну (pNa) під дією тромбіну визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 405 нм на спектрофотометрі для мікропланшетів Thermo Multiskan EX (Фінляндія).

Результати протромбінового та екамулінового тестів виражали у вигляді протромбінового (ПВ) та екамулінового (ЕВ) відношень:

$$\text{ПВ} = A_d/A_k \quad (1),$$

$$\text{ЕВ} = A_d/A_k \quad (2),$$

де A_d — амідолітична активність тромбіну, що утворився в досліджуваній плазмі крові під

дією тромбопластину (1) та екамуліну (2); A_k — амідолітична активність утвореного тромбіну плазми крові тварин контрольної групи під дією тромбопластину (1) та екамуліну (2) [16, 17].

Показники екамулінового та тромбопластинового тестів у щурів контрольної групи використовували для обрахунку екамулінового та протромбінового відношення.

Експериментальні дані обробляли загальноприйнятими методами статистики з використанням критерію Стюдента [18].

Результати та обговорення

У зв'язку з невинним зростанням частоти захворювань гепатобіліарної системи, що характеризуються прогресуючим протіканням та несприятливим прогнозом, поруч з якісною і своєчасною діагностикою характеру патологічного процесу, значної актуальності набуває визначення критеріїв ефективності існуючих і нових терапевтичних препаратів.

З метою відновлення функціонального стану печінки застосовують препарати різних фармакологічних груп природного і синтетичного походження. Необхідно відмітити, що застосування вже наявних фармакологічних засобів не завжди дає очікуваний результат. Тому пошук нових препаратів і дослідження їхньої ефективності набувають важливого значення.

У разі захворювань печінки часто виникають порушення у функціонуванні системи гемостазу, які діагностують, як правило, за значним подовженням часу зсідання плазми крові в тесті «протромбіновий час» (ПЧ), за зростанням вмісту продуктів деградації фібриногену/фібрину та розвитком тромбоцитопенії (менше $100 \times 10^9/\text{л}$ тромбоцитів) [11, 19].

Наші дослідження були спрямовані на визначення інформативності низки діагностичних тестів для контролю за ступенем відновлення функціонального стану печінки та ефективністю лікувальних

препаратів у разі токсичного гепатиту. У першу чергу, для загальної характеристики стану системи гемостазу у щурів з експериментальним гепатитом визначено вміст у плазмі крові ключових протеїнів системи зсідання крові та фібринолізу — фібриногену і плазміногену. У зв'язку з тим, що під дією тромбіну чи тромбіноподібного ензиму полімеризація фібриногену у плазмі крові піддослідних щурів групи самореабілітації була порушена, визначення вмісту фібриногену за утворенням фібринового згустку було недостовірним. Тому для точного визначення вмісту фібриногену в плазмі крові використано метод його висолування розчином натрію сульфату [14].

Внаслідок цього встановлено (табл. 1), що відсоток фібриногену у плазмі крові хворих щурів 1-ої групи за умов самореабілітації відзначається тенденцією до зниження на 14,7% порівняно з контролем. У тварин 2- і 3-ої дослідних груп під час застосування фосфоліпидовмісних лікувальних засобів з репаративними властивостями («Есенціале-форте» і БАД FLP-MD відповідно) вміст фібриногену у плазмі крові є стабільним, у межах контрольних значень і вірогідно вищим (відповідно на 10,4 та 17,0%) порівняно з його значеннями у тварин 1-ої групи. Таким чином, кількісні зміни параметрів фібриногену у плазмі крові щурів хворих на токсичний гепатит свідчать про наявність порушень протеїнсинтезувальної функції печінки та нормалізуючий вплив фосфоліпидовмісних лікувальних засобів, у т.ч. БАД FLP-MD.

Результативизначення вмісту плазміногену у плазмі крові тварин свідчать про те, що у хворих щурів 1-ої групи за умов самореабілітації відзначається тенденція до зниження вмісту плазміногену на 24,2% порівняно з контролем (табл. 1). У тварин 2- та 3-ої дослідних груп цей показник відповідає контрольному рівню. При цьому рівень плазміногену у плазмі крові тварин 2-ої групи є вірогідно вищим на 26,5%,

Таблиця 1. Вміст фібриногену та плазміногену у плазмі крові щурів за експериментальних умов ($M \pm m$; $n = 20$)

Групи тварин	Фібриноген ¹	Плазміноген ¹
1-а — самореабілітація	$85,3 \pm 3,5$	$75,8 \pm 6,0$
2-а — Есенціале-форте	$95,7 \pm 2,1^*$	$102,3 \pm 4,9^*$
3-я — БАД FLP-MD	$102,3 \pm 4,0^*$	$93,0 \pm 6,1$

Примітка: 1 — вміст фібриногену та плазміногену показано у відсотках відносно вмісту цих протеїнів у плазмі крові здорових щурів; * $P < 0,05$, різниця вірогідна порівняно із показниками плазми крові щурів 1-ої групи

а у щурів 3-ої групи є тенденція до збільшення на 17,2% порівняно з його величиною у тварин 1-ої групи. Встановлені закономірності також свідчать про зміни протеїнсинтезувальної функції печінки у хворих тварин та можливість їхнього коригування лікувальними засобами репаративної дії.

Отже, в сукупності з іншими специфічними показниками, визначення вмісту фібриногену та плазміногену може бути включено до констеляцій, що характеризують функціональний стан печінки та ефективність терапевтичних засобів.

Для характеристики функціонального стану коагуляційних факторів у разі захворювань печінки, як зазначалось вище, застосовують тест ПЧ, принцип якого базується на визначенні часу зсідання плазми крові під дією екзогенного тромбoplastину, що характеризує зовнішній шлях плазмове гемостазу та опосередковано вказує на рівень функціонально активного протромбіну [13]. У цьому разі протромбіновий час визначають з використанням кальцію хлориду та тромбoplastину, стандартизованого за міжнародним індексом чутливості (МІЧ). Результати ПЧ представляють у вигляді міжнародного нормалізованого відношення (МНВ) за формулою $MNB = (PCh_{\text{пацієнта}} / PCh_{\text{контролю}})^{MICH}$, де $PCh_{\text{пацієнта}}$ – протромбіновий час зсідання плазми крові пацієнта, $PCh_{\text{контролю}}$ – протромбіновий час зсідання плазми крові донорів.

У тесті реалізується низка послідовних і взаємопов'язаних реакцій і час зсідання плазми крові залежить не тільки від сумарної швидкості процесу активації коагуляційних факторів, але і від присутності інгібіторів полімеризації фібрину. У зв'язку з цим, діагностика стану системи зсідання крові у разі порушення функціонування печінки коагуляційними методами ускладнена. Крім того, фібриноген внаслідок такої патології може мати аномалії в структурі (надлишок залишків сіалових кислот або зменшену молекулярну масу), що призводить до подовження часу зсідання плазми крові. Таким чином, незважаючи на очевидну простоту виконання тесту ПЧ, трактування його результатів становить серйозну та актуальну проблему.

Для удосконалення методу ми розробили умови, при яких процес активації протромбіну фіксується спектрофотометрично за розщепленням хромогенного тромбінспецифічного субстрату. Такий підхід дає можливість виключати вплив інгібіторів полімеризації фібрину, оскільки тромбін, що утворився під

дією активатора, призводить до розщеплення хромогенного субстрату, а не до перетворення фібриногену на фібрин з наступною його полімеризацією (як у коагуляційному тесті ПЧ).

Дослідження стану системи гемостазу показали, що тести на основі тромбінспецифічного хромогенного субстрату, на відміну від хронометричних тестів, менш чутливі до низькомолекулярного та нефракціонованого гепарину і дозволяють визначати реальний вміст протромбіну у плазмі крові [17].

Відомо, що окрім ПЧ для моніторингу стану системи зсідання крові та виявлення у кровотоці функціонально неактивних вітамін К-залежних протеїнів (PIVKA-протеїнів) використовують тест «екариновий час». Цей тест базується на визначенні часу зсідання плазми крові під дією активатора протромбіну – екарину, виділеного з отрути ефі піщаної (*Echis carinatus*), який здатен активувати протромбін та його функціонально неактивні форми [9]. Таким чином, сумарний рівень протромбіну можна визначати, використовуючи ензими-активатори протромбіну з отрути змії.

Одним із таких ензимів-активаторів протромбіну є екамулін, виділений з отрути ефі багатолускової (*Echis multisquamatis*), який ми застосовували в цих дослідженнях. Екамулін, на відміну від тромбoplastину, активує як протромбін, так і його PIVKA-форму. Отже, за різницею показників екамулінового та тромбoplastинового тестів можна оцінювати вміст функціонально неактивного протромбіну.

Для контролю ефективності терапії, спрямованої на відновлення функціонального стану печінки, необхідно визначати вміст не тільки функціонально активного протромбіну, але і його PIVKA-форму. Накопичення PIVKA-протромбіну призводить до зниження прокоагулянтного потенціалу системи зсідання крові. Спосіб контролю ефективності дії препаратів для лікування гепатиту та відновлення синтезу протеїнів гепатоцитами базується на порівнянні результатів тестів на основі тромбoplastину та екамуліну, що дозволяє визначати загальний вміст протромбіну та PIVKA-протромбіну плазми крові. Використання тромбінспецифічного хромогенного субстрату дає можливість визначати функціональну активність протромбіну максимально незалежно від впливу екзогенних та ендогенних інгібіторів системи зсідання крові.

Результати тестів з використанням екамуліну та тромбoplastину представили

Таблиця 2. Загальний рівень протромбіну та PIVKA-протромбіну у плазмі крові щурів за експериментальних умов ($M \pm m$; $n = 20$)

Групи тварин	Протромбінове відношення (ПВ)	Екамулінове відношення (ЕВ)
1-а – самореабілітація	$0,4 \pm 0,06$	$0,70 \pm 0,06$
2-а – Есенціале-форте	$1,04 \pm 0,07^*$	$0,93 \pm 0,03^*$
3-я – БАД FLP-MD	$0,95 \pm 0,08^*$	$0,98 \pm 0,07^*$

* $P < 0,05$, різниця вірогідна порівняно із показниками плазми крові щурів 1-ої групи

у вигляді протромбінового та екамулінового відношення, які розраховували за відношенням амідолітичної активності досліджуваної плазми крові до амідолітичної активності контрольної плазми крові. За різницею між екамуліновим та тромбопластиновим відношенням, визначали вміст PIVKA-протромбіну (табл. 2).

Зазначений підхід ми використали для характеристики стану системи зсідання крові щурів у разі токсичного гепатиту. Досліджено плазму крові щурів, яких лікували препаратом «Есенціале-форте» (2-га група), БАД FLP-MD (3-тя група) та 1-ої групи (самореабілітація).

Показано, що протромбінове відношення у хворих щурів в умовах самореабілітації нижче одиниці (ПВ = $0,4 \pm 0,06$). Отже, функціональна активність протромбіну знижена на 60%. ЕВ дорівнює $0,70 \pm 0,06$, тобто синтез протромбіну у порівнянні з нормою знижено на 30%. Про накопичення PIVKA-протромбіну свідчить низький рівень функціонально активного протромбіну. Таким чином, в умовах самореабілітації не відбувається відновлення протеїнсинтезуючої функції гепатоцитів.

ПВ та ЕВ під час лікування щурів препаратом «Есенціале-форте» та БАД FLP-MD практично дорівнює 1, що свідчить про відновлення функціонального стану печінки: відбувається нормальний синтез функціонально активних вітамінів К-залежних протеїнів. Можна стверджувати, що ліпосомна форма БАД FLP-MD сприяє ефективному відновленню протеїнсинтезувальних процесів у печінці.

Отже, використання рекомендованого нами діагностичного підходу для визначення функціонального стану печінки (протеїнсинтезуючої функції) полягає в безпосередньому контролі відновлення синтезу функціонально активних вітамінів К-залежних

протеїнів; забезпеченні високої точності та відтворюваності результатів тесту; нечутливості тесту до впливу екзо- та ендогенних інгібіторів системи зсідання крові. Зазначені діагностичні тести дозволяють швидко та якісно здійснювати аналіз ефективності нових лікувальних схем та препаратів, як показано на прикладі порівняльної оцінки ефективності еталонного препарату «Есенціале-форте» та новоствореної ліпосомної форми БАД FLP-MD, виготовленої на основі фосфоліпідів різного походження.

ОЦЕНКА ПРОТЕИНСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГЕПАТИТЕ

В. А. Грищенко¹, В. А. Томчук¹,
О. М. Литвиненко¹, В. А. Чернышенко^{2,3},
В. И. Грищук², Т. Н. Платонова²

¹Национальный университет биоресурсов
и природопользования Украины, Киев;

²Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;

³Киевский национальный университет
имени Тараса Шевченко, Украина;
e-mail: dimokmpx@bigmir.net

Протеинсинтезирующую функцию печени оценивали по содержанию протромбина и его неактивной формы PIVKA-протромбина, накопление которого является маркером нарушения функционального состояния печени. Разработанные диагностические тесты позволяют оценить эффективность действия стандартного препарата «Эссенциале-форте» и липосомной формы БАД FLP-MD, созданной на основе фосфолипидов разного происхождения.

Ключевые слова: токсичный гепатит, PIVK-протромбин, диагностика.

AN ESTIMATE OF PROTEIN SYNTHESIS IN LIVER UNDER INDUCED HEPATITIS

V. A. Hryshenko¹, V. A. Tomchuk¹,
O. M. Lytvynenko¹, V. O. Chernyshenko^{2,3},
V. I. Gryshuk², T. M. Platonova²

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv;

²Palladin Institute of Biochemistry of National Academy of Science of Ukraine, Kyiv;

³Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;
e-mail: dimokmpx@bigmir.net

Summary

Liver protein synthesis was estimated comparing the levels of prothrombin and its inactive form PIVKA-prothrombin. The latter indicates liver dysfunction. These diagnostic tests allow monitoring the effectiveness of the commonly applied preparation "Essentiale Forte" and that of the liposomal form of the biologically active additive (BAA) FLP-MD based on phospholipids of various origin.

Key words: toxic hepatitis, PIVKA-prothrombin, diagnostic.

1. Сердюков Я. К., Литвиненко О. М., Грищенко В. А. // Соврем. пробл. токсикол. — 2008. — № 2. — С. 63–65.
2. Литвиненко О. М. Показники ліпідного та жовчно-кислотного обмінів за експериментального медикаментозного гепатиту та їх корекція. Дис. канд. біол. наук. — К. 2010. — 24 с.
3. Бышевский А. Ш., Галян С. Л. Биохимические сдвиги в диагностике патологических состояний (с элементами патохимии). — Новосибирск, 1993. — 200 с.
4. Кунц Э., Гундерманн К.-Й., Шнайдер Э. // Терапев. архив — 1994. — 66, № 2. — С. 66–72.
5. Мельничук Д. О., Грищенко В. А., Литвиненко О. М. // Доп. НАН України. — 2007. — № 12. — С. 173–175.
6. Грищенко В. А., Литвиненко О. М. // Наук. вісн. Львівської нац. академії ветеринарної медицини ім. С. З. Гжицького. — 2007. — 9, № 3 (34). Ч. 2. — С. 54–57.
7. Пат. 86516 Україна, МПК А 61К 35/20 А 23К 1/00. Ветеринарна біологічно активна добавка ліпосомальної форми та спосіб репаративної терапії в гепатології / Мельничук Д. О., Грищенко В. А., Литвиненко О. М. Опубл. 27.04.2009, Бюл. № 8.
8. *Hematology: basic and practice* // Ed. by Hoffman R., Benz E. J., Shattil S. J. et al. — New York: Churchill Livingstone, 1995. — 2369 p.
9. Solano C., Cobcroft R. G., Scoft D. C. // *Thromb. Haemost.* — 1990. — 64, N 3. — P. 353–357.
10. Зубауров Д. М. // *Биология*. — 2001. — № 1. — С. 9–13.
11. Катикова О. Ю., Ших Е. В. // *Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопрокт.* — 2009. — № 3. — С. 21–31.
12. Литвиненко О. М., Грищенко В. А. // Тези доп. IV Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» / Львів, квітень 2008 р. — С. 432–433.
13. *Лабораторная диагностика нарушений гемостаза* / Долгов В. В., Свирин П. В. — М.-Тверь: ООО Издательство «Триада», 2005. — 227с.
14. Варецька Т. В. // *Укр. біохім. журн.* — 1960. — 32, № 2 — С. 13–24.
15. Deutsch D. G., Mertz E. T. // *Science*. — 1970. — 170, N 3962. — P. 1095–1096.
16. Корольова Д. С., Деев В. А., Куповська С. І. та ін. // *Лаб. діагностика*. — 2009. — № 2 (48). — С. 3–12.
17. Корольова Д. С., Виноградова Р. П., Чернишенко Т. М. та ін. // *Там само*. — 2006. — № 3 (37). — С. 18–22.
18. *Сучасні методи біохімічних досліджень* / Кучеренко М. Є., Бабенюк Ю. Д., Войціцький В. М. — К.: Фітосоціоцентр, 2001 — 424 с.
19. Gasbarrini A., Rapaccini G. L., Rutella S. et al. // *Dig. Liver Dis.* — 2007. — 39. — P. 878–882.

Отримано 24.01.2011