

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Восточная
Европа

lab.recipe.by

2020, том 9, № 1–2

Основан в 2011 г.

Беларусь

Журнал зарегистрирован
Министерством информации
Республики Беларусь 02.12.2011
Регистрационное свидетельство № 1496

Учредитель:
УП «Профессиональные издания»
при участии Республиканского научного
общества специалистов клинической
лабораторной диагностики Беларуси

Адрес редакции:
220049, Минск, ул. Кнорина, 17
Тел.: +375 (17) 322 16 77, +375 (17) 322 16 78
e-mail: lab@recipe.by

Директор Евтушенко Л.А.
Заместитель главного редактора Жабинский А.В.
**Руководитель службы рекламы
и маркетинга** Коваль М.А.
Технический редактор Нужин Д.В.

Украина

Журнал зарегистрирован
Государственной регистрационной
службой Украины 02.12.2014
Регистрационное свидетельство № 21184-10984ПР

Учредители:
Национальная медицинская академия
последипломного образования имени П.Л. Шупика
УП «Профессиональные издания»

Офис в Украине:
ООО «Профессиональные издания. Украина»
04116, Киев, ул. Старокиевская, 10-г, сектор «В»,
офис 201

Контакты:
тел.: +38 (044) 33 88 704, +38 (067) 102 73 64
e-mail: pl_info@ukr.net

Подписка

в каталоге РУП «Белпочта» (Беларусь)
индивидуальный индекс **01389**
ведомственный индекс **013892**

в каталоге ОАО «Арзи» (Российская Федерация)
индекс **01389**

в каталоге АО «Казпочта» (Казахстан)
индекс **01389**

В Украине подписка оформляется через офис
ООО «Профессиональные издания. Украина»

01389 – единый индекс в электронных каталогах
«Газеты и журналы» на сайтах агентств:
ООО «Информнаука» (Российская Федерация),
АО «МК-Периодика» (Российская Федерация),
ООО «Прессинформ» (Российская Федерация),
ООО «НПО «Информ-система» (Российская Федерация),
ГП «Пресса» (Украина),
ГП «Пошта Молдовей» (Молдова),
АО «Летувос паштас» (Литва),
Kibon&Sagner (Германия),
ООО «Подписное агентство PKS» (Латвия),
Фирма «INDEX» (Болгария)

Электронная версия журнала доступна
на сайте lab.recipe.by, в Научной электронной
библиотеке eLibrary.ru, в базе данных East View,
в электронной библиотечной системе IPRbooks

По вопросам приобретения журнала обращайтесь
в редакцию в Минске
и офис в Киеве

Журнал выходит 1 раз в 3 месяца.
Цена свободная

Подписано в печать 27.03.2020.
Тираж в Беларуси 1000 экз.
Тираж в Украине 2000 экз.
Заказ №

Формат 70x100 1/16. Печать офсетная

Отпечатано

Производственное дочернее унитарное предприятие
«Типография Федерации профсоюзов Беларуси».
Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий
№2/18 от 26.11.2013.
пл. Свободы, 23-103, г. Минск.
ЛП №02330/54 от 12.08.2013.

© «Лабораторная диагностика. Восточная Европа»

Авторские права защищены. Любое воспроизведение материалов издания возможно только с письменного
разрешения редакции с обязательной ссылкой на источник.

© УП «Профессиональные издания», 2020

© Оформление и дизайн УП «Профессиональные издания», 2020

Главный редактор

Камышников Владимир Семенович,
д.м.н., профессор, заведующий кафедрой
клинической лабораторной диагностики
Белорусской медицинской академии
последипломного образования

Редакционная коллегия:

Алехнович Л.И., к.м.н., доц. (Минск)
Бадыгина Н.А., к.б.н. (Минск)
Беляев С.А. (Минск)
Вергун О.М., к.б.н., доц. (Минск)
Владимирская Т.Э., к.б.н. (Минск)
Гусина Н.Б., к.м.н., доц. (Минск)
Доценко Э.А., д.м.н., проф. (Минск)
Дубровский А.Ч., к.м.н. (Минск)
Качеровская Е.Р. (Минск)
Коломиец Н.Д., д.м.н., проф. (Минск)
Коневалова Н.Ю., д.б.н., проф. (Витебск)
Костин Г.М., к.м.н., доц. (Минск)
Костюк С.А., д.м.н., доц. (Минск)
Кочетов А.Г., д.м.н. (Москва)
Кузнецов О.Е., к.м.н., доц. (Гродно)
Кузьменко А.Т., к.м.н., доц. (Минск)
Лелевич В.В., д.м.н., проф. (Гродно)
Ляликов С.А., д.м.н., проф. (Гродно)
Новикова И.А., д.м.н., проф. (Гомель)
Потапнев М.П., д.м.н., проф. (Минск)
Прохорова В.И., д.м.н., проф. (Минск)
Смирнова Л.А., д.м.н., проф. (Минск)
Смолякова Р.М., д.б.н., доц. (Минск)
Таганович А.Д., д.м.н., проф. (Минск)
Хуторян Л.М. (Челябинск)

Главный редактор

Лунёва Анна Геннадиевна,
д.м.н., профессор, заведующая кафедрой
клинической лабораторной диагностики
Национальной медицинской академии
последипломного образования имени П.Л. Шупика,
президент Всеукраинской ассоциации
клинической химии и лабораторной медицины

Редакционная коллегия:

Бодня Е.И., д.м.н., проф. (Харьков)
Воронцова Л.Л., д.м.н., проф. (Запорожье)
Вьюницкая Л.В., к.б.н., доц. (Киев)
Гавриленко Т.И., д.б.н., проф. (Киев)
Ермоленко Т.А., д.м.н., проф. (Одесса)
Завадецкая Е.П., к.м.н., доц. (Киев)
Зяблицев С.В., д.м.н., проф. (Донецк)
Игнатъев А.М., д.м.н., проф. (Одесса)
Клименко С.В., д.м.н., проф. (Киев)
Клищ И.Н., д.б.н., проф. (Тернополь)
Криницкая И.Я., д.м.н., проф. (Тернополь)
Лаповец Л.Е., д.м.н., проф. (Львов)
Леонтьева Ф.С., к.б.н. (Харьков)
Липкан Г.Н., д.м.н., проф. (Киев)
Магомедов А.М., д.б.н., проф. (Киев)
Мацегора Н.А., д.м.н., проф. (Одесса)
Медведева И.М., к.м.н. (Сумы)
Олейник Е.А., к.м.н., доц. (Киев)
Проценко В.Н., к.м.н., доц. (Харьков)
Ткач Ю.И., д.м.н., проф. (Харьков)
Хейломский А.Б. (Киев)
Шахнин Д.Б., к.х.н. (Киев)
Якимова Т.П., д.м.н., доц. (Харьков)
Ястремська О.О., к.м.н., доц. (Львов)

Рецензируемое издание

Журнал входит в Перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования результатов диссертационных исследований. Решение коллегии ВАК от 24.10.2012 (протокол № 06-18/2).

Научные статьи, опубликованные в журнале, для украинских соискателей ученых степеней на основании приказа МОНмолодьспорта Украины от 17.10.2012 № 1112 приравниваются к зарубежным публикациям.

Журнал включен в базы данных Ulrich's Periodicals Directory, EBSCO, РИНЦ.

Ответственность за точность приведенных фактов, цитат, собственных имен и прочих сведений, а также за разглашение закрытой информации несут авторы.

Редакция может публиковать статьи в порядке обсуждения, не разделяя точки зрения автора.

Ответственность за содержание рекламных материалов и публикаций с пометкой «На правах рекламы» несут рекламодатели.

International Scientific Journal

LABORATORY Diagnostics

Eastern Europe

Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa

lab.recipe.by

2020 Volume 9 Number 1-2

Founded in 2011

Belarus

The journal is registered
in the Ministry of information
of the Republic of Belarus 02.12.2011
Registration certificate № 1496

Founder:
UE "Professional Editions" with the participation
of the Republican scientific society of experts of the clinical
laboratory diagnostics of Belarus

Address of the editorial office:
220049, Minsk, Knorin str., 17
Phone: +375 (17) 322 16 77, +375 (17) 322 16 78
e-mail: lab@recipe.by

Director Evtushenko L.
Deputy editor-in-chief Zhabinski A.
Head of advertising and marketing Koval M.
Technical editor Nuzhin D.

Ukraine

The journal is registered
at the State registry of Ukraine 02.12.2014
Registration certificate № 21184-10984PR

Founders:
Shupyk National Medical Academy
of Postgraduate Education
UE "Professional Editions"

Office in Ukraine:
LLC "Professional Editions. Ukraine"
04116, Kyiv, Starokievskaya str., 10-g, sector "B",
office 201

Contacts:
phone: +38 (044) 33 88 704, +38 (067) 102 73 64
e-mail: pl_info@ukr.net

Subscription
in the Republican unitary enterprise "Belposhta"
individual index **01389**
departmental index **013892**

in catalogue JSC "ARZI" (Russian Federation)
index **01389**

in JSC "Kazpochta" catalogue (Kazakhstan)
index **01389**

In Ukraine the subscription is made out through office
LLC "Professional Edition. Ukraine"

Index **01389** in the electronic catalogs "Newspapers
and Magazines" on web-sites of agencies:
LLC "Informnauka" (Russian Federation),
JSC "MK-Periodika" (Russian Federation),
LLC "Pressinform" (Russian Federation),
LLC "SPA "Inform-system" (Russian Federation),
SE "Press" (Ukraine),
SE "Poshta Moldovey" (Moldova),
JSC "Letuvos pashtas" (Lithuania),
Kubon&Sagner (Germany),
LLC "Subscription Agency PKS" (Latvia),
INDEX Firm agency (Bulgaria)

The electronic version of the journal
is available on lab.recipe.by,
on the Scientific electronic library eLibrary.ru,
in the East View database, in the electronic
library system IPRbooks

Concerning acquisition of the journal address
to the editorial office in Minsk
and the office in Kyiv

The frequency of journal is 1 time in 3 months.
The price is not fixed

Sent for the press 27.03.2020.
Circulation in Belarus is 1000 copies
Circulation in Ukraine is 2000 copies
Order №

Format 70x100 1/16 Litho

Printed in printing house

© "Laboratory diagnostics. Eastern Europe"

Copyright is protected. Any reproduction of materials of the edition is possible only with written
permission of edition with an obligatory reference to the source.

© "Professional Editions" Unitary Enterprise, 2020

© Design and decor of "Professional Editions" Unitary Enterprise, 2020

Belarus

Editor-in-Chief Vladimir S. Kamyshnikov,
Doctor of Medical Sciences, Professor,
Head of Clinical Laboratory Diagnostics Department
of Belarusian Medical Academy of Postgraduate
Education (Minsk)

Editorial Board:

Alekhnovich L., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Minsk)
Badygina N., Cand. of Biol. Sci. (Minsk)
Beliaev S. (Minsk)
Dotsenko E., Dr. of Med. Sci., Prof. (Minsk)
Dubrovsky A., Cand. of Med. Sci. (Minsk)
Gusina N., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Minsk)
Hutoryan L. (Chelyabinsk)
Kacherovskaya E. (Minsk)
Kochetov A., Dr. of Med. Sci. (Moscow, Russia)
Kolomiets N., Dr. of Med. Sci., Prof. (Minsk)
Konevalova N., Dr. of Biol. Sci., Prof. (Vitebsk)
Kostin G., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Minsk)
Kostyuk S., Dr. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Minsk)
Kuzmenko A., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Minsk)
Kuznetsov O., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Grodno)
Lelevich V., Dr. of Med. Sci., Prof. (Grodno)
Lyalikov S., Dr. of Med. Sci., Prof. (Grodno)
Novikova I., Dr. of Med. Sci., Prof. (Gomel)
Potapnev M., Dr. of Med. Sci., Prof. (Minsk)
Prokhorova V., Dr. of Med. Sci., Prof. (Minsk)
Smirnova L., Dr. of Med. Sci., Prof. (Minsk)
Smolyakova R., Dr. of Biol. Sci., Prof. (Minsk)
Taganovich A., Dr. of Med. Sci., Prof. (Minsk)
Vergun O., Cand. of Biol. Sci., Assoc. Prof. (Minsk)
Vladimirskaya T., Cand. of Biol. Sci. (Minsk)

Ukraine

Editor-in-Chief Ganna G. Lunova,
Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of Clinical
Laboratory Diagnostics Department of Shupyk
National Medical Academy of Postgraduate Education,
President of Ukrainian Association of Clinical
Chemistry and Laboratory Medicine (Kyiv)

Editorial Board:

Bodnya E., Dr. of Med. Sci., Prof. (Kharkiv)
Ermolenko T., Dr. of Med. Sci., Prof. (Odessa)
Gavrilenko T., Dr. of Biol. Sci., Prof. (Kyiv)
Ignatyev A., Dr. of Med. Sci., Prof. (Odessa)
Kheilomskyi A. (Kyiv)
Klimenko S., Dr. of Med. Sci., Prof. (Kyiv)
Klishch M., Dr. of Biol. Sci., Prof. (Ternopil)
Krinitckaya I., Dr. of Med. Sci., Prof. (Ternopil)
Lapovets L., Dr. of Med. Sci., Prof. (Lviv)
Leont'eva F., Cand. of Biol. Sci. (Kharkiv)
Lipkan G., Dr. of Med. Sci., Prof. (Kyiv)
Magomedov A., Dr. of Biol. Sci., Prof. (Kyiv)
Matsegora N., Dr. of Med. Sci., Prof. (Odessa)
Medvedeva I., Cand. of Med. Sci. (Sumy)
Oliyynyk E., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Kyiv)
Protsenko V., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Kharkiv)
Tkach Yu., Dr. of Med. Sci., Prof. (Kharkiv)
Shakhnin D., Cand. of Chemic. Sci. (Kyiv)
Vorontsova L., Dr. of Med. Sci., Prof. (Zaporizhia)
Vyyunitskaya L., Cand. of Biol. Sci., Assoc. Prof. (Kyiv)
Yakimova T., Dr. of Med. Sci., Prof. (Kharkiv)
Yastremska O., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Lviv)
Zavadetskaya E., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof. (Kyiv)
Zyblitsev S., Dr. of Med. Sci., Prof. (Donetsk)

Peer-Reviewed Edition

The journal is included into a List of scientific publications of the Republic of Belarus for the publication of the results of the dissertation research. HCC board decision of 12.10.2012 (protocol № 06-18/2).

Scientific articles published in the journal for Ukrainian applicants of academic degrees on the basis of the order of Ministry of Education and Science, Youth and Sports of Ukraine from 17.10.2012 № 1112 are equated to foreign publications.

The journal is included in the databases Ulrich's Periodicals Directory, EBSCO, RSCI.

Responsibility for the accuracy of the given facts, quotes, own names and other data, and also for disclosure of the classified information authors bear.

Editorial staff can publish articles as discussion, without sharing the point of view of the author.

Responsibility for the content of advertising materials and publications with the mark "On the Rights of Advertising" are advertisers.

Уважаемые читатели!

Настоящий номер журнала открывается серией публикаций, посвященных становлению лабораторной медицины и службы клинической лабораторной диагностики в Республике Беларусь, а также значимости для ее развития 50-летней образовательной, научной, лечебно-диагностической, консультационной, организационно-методической и редакционно-издательской деятельности кафедры клинической лабораторной диагностики БелМАПО – в связи с ее знаменательным юбилеем.

Не может не привлечь внимание и статья ведущих специалистов клинической лабораторной диагностики России об унификации процедур цитохимического окрашивания эякулята для определения фертильности мужчин.

Не менее важной представляется и статья белорусских специалистов-медиков, посвященная ранней, дородовой лабораторной диагностике врожденных пороков развития жизненно важных органов плода.

Хотелось бы отметить, что в течение более чем 9-летнего периода существования журнала на его страницах были обсуждены помимо многих научных проблем наиболее важные вопросы деятельности клинической лабораторной службы, а также подготовки профессиональных и научных кадров в этой сфере деятельности.

Так, профессором А.Г. Лунёвой была представлена обстоятельная информация о мероприятиях по изменению штатно-кадровой структуры клиничко-диагностических лабораторий Украины, о реформировании медицинских лабораторий лечебно-профилактических учреждений г. Киева, о разработке модели индикаторов качества и их внедрении в работу клиничко-диагностических лабораторий, а также о валидации и верификации количественных методик клинических лабораторных исследований, о новых подходах к оцениванию специалистов, работающих в медицинских лабораториях, о лицензировании и непрерывном совершенствовании профессиональной деятельности врачей лабораторной медицины в Украине.

Все затронутые Анной Геннадиевной вопросы и сделанные ею предложения нашли отклик в виде публикаций белорусских авторов, что во многом способствовало выработке правильной тактики дальнейшего развития лабораторной службы в Республике Беларусь и Украине. В последнее время обсуждался проект совместного участия кафедр клинической лабораторной диагностики Национальной медицинской академии последипломного образования имени П.Л. Шупика и Белорусской медицинской академии последипломного



образования в программе Европейского союза Эразмус+ по усовершенствованию процесса сертификации специалистов клинической лабораторной диагностики в странах-участниках проекта с целью признания соответствия уровня их квалификации требованиям Европейского реестра специалистов лабораторной медицины. Хотелось бы надеяться на то, что это начинание профессора А.Г. Лунёвой, сердце которой, к великому сожалению, перестало биться в начале текущего года, сможет получить дальнейшее развитие.

Белорусские представители редакционной коллегии международного научно-практического журнала «Лабораторная диагностика. Восточная Европа», профессорско-преподавательский коллектив кафедры клинической лабораторной диагностики БелМАПО и все специалисты клинической лабораторной службы Республики Беларусь выражают глубокие соболезнования по поводу невозможной потери – безвременного ухода из жизни замечательного Человека, обладавшего незаурядными духовными качествами, талантливого ученого, прекрасного педагога, крупного организатора здравоохранения Украины в области лабораторной медицины, внесшего исключительно большой вклад в совершенствование деятельности службы клинической лабораторной диагностики, высококвалифицированного специалиста в области лабораторной медицины, прошедшего путь от врача-лаборанта до заведующего кафедрой клинической лабораторной диагностики Национальной медицинской академии последипломного образования имени П.Л. Шупика и Президента Всеукраинской ассоциации клинической химии и лабораторной медицины – Лунёвой Анны Геннадиевны.

Глубоко скорбим по поводу постигшей всех нас большой, невозможной утраты.

Главный редактор в Беларуси
Камышников Владимир Семенович



Организация деятельности клинико-лабораторной службы

Становление лабораторной медицины в Республике Беларусь и вклад в ее развитие кафедры клинической лабораторной диагностики Белорусской медицинской академии последиplomного образования (к 50-летию кафедры)
Камышников В.С. 9

Роль кафедры клинической лабораторной диагностики БелМАПО в совершенствовании лабораторной химико-токсикологической службы Республики Беларусь
Кузьменко А.Т., Камышников В.С., Чубуков А.М. 32

Современные технологии и методы лабораторной диагностики инфекционных заболеваний: вклад в их реализацию лабораторной службы городской клинической инфекционной больницы г. Минска
Анисько Л.А., Рогачева Т.А. 37

Лабораторная диагностика нарушений мужской фертильности

Унификация процедур цитохимического окрашивания эякулята для определения фертильности мужчины
Сапожкова Ж.Ю., Еремин К.И., Долгов В.В. 41

Оригинальные исследования

Биохимические исследования околоплодных вод как необходимый этап осуществления дородовой диагностики врожденных пороков развития органов пищеварительной системы
Чуканов А.Н., Курлович И.В., Семенчук В.Л., Виктор С.А. 50

Естественные факторы, влияющие на уровень бета-лактамазной активности сыворотки крови человека
Жильцов И.В. 60

Особенности минерализации костной ткани при сочетанном употреблении аторвастатина и оксипроизводного витамина D (α -кальцидола) (экспериментальное исследование)
Осочук С.С., Яковлева О.С. 68

Особенности клеточных факторов иммунитета у мужчин с нарушением репродуктивной функции при наличии токсокарозной инвазии
Воронцова Л.Л., Кенийз С.А., Коваленко В.А. 76

Лабораторные исследования в спортивной медицине

Зависимость биохимических маркеров здоровья от уровня спортивного мастерства в пубертатном периоде
Чиркин А.А., Алтани М.С., Степанова Н.А., Чиркина А.А. 87

Новые технологии в лабораторной диагностике

Трансляционная лабораторная медицина: прогнозирование осложненного течения острого коронарного синдрома с использованием инновационных технологий оценки сопряжения процессов антиоксидантной защиты, протео- и фосфолиполиза
Камышников В.С., Яковлев-Малых Н.Н., Литвинко Н.М., Свиридов О.В., Дубовская Л.В., Юрага Т.М., Борисенко Т.Д. 98

Оценка защитной реакции липидных структур сыворотки крови и спермоплазмы на воздействие фактора, инициирующего состояние оксидативного стресса
Пехтерева Н.В., Камышников В.С., Хоровец А.И., Жуковец Т.А. 116

Лабораторно-диагностическая технология одновременного определения в пробе анализируемого материала (ткани, биологической жидкости) гомоцистеина и других физиологически активных аминокислот с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии
Дорошенко Е.М., Новгородская Я.И. 135

Приглашение к дискуссии

К обсуждению проблемы «нормальных» величин: сравнительный анализ клеточного состава крови и уровней содержания в ней белков у спорадических и регулярных доноров
Таганович А.Д., Ковганко Н.Н., Прохорова В.И., Готько О.В., Левандовская О.В. 144

Аллергическая реакция на β -лактамы антибиотики – карбапенемы (обзор литературы и клинический случай)
Лапцевич А.В., Кондаурова С.Л., Липницкий А.В. 155

Некролог

Памяти Лунёвой Анны Геннадиевны – главного редактора журнала «Лабораторная диагностика. Восточная Европа» в Украине 164

Laboratory Diagnostics of Male Infertility

Unification of Procedures of Cytochemical Staining of Human Ejaculate to Determine the True Fertility of Men
Sapozhkova Zh., Eremin K., Dolgov V.41

Original Researches

Biochemical Studies of Amniotic Fluid as a Necessary Stage in the Implementation of Prenatal Diagnosis of Congenital Malformations of the Digestive System
Chukanov A., Kurlovich I., Semenchuk V., Victor S.50

Natural Factors That Affect the Level of Beta-Lactamase Activity of Human Serum
Zhylytsou I.60

Features of Bone Mineralization in Combined Use of Atorvastatin and α -Calcidol (Experimental Study)
Osochuk S., Yakovleva O.68

Peculiarities of Cellular Factors of Immunity in Men with Disorder of Reproductive Function in the Presence of Toxocariasis Invasion
Vorontsova L., Keniyz S., Kovalenko V.76

Laboratory Researches in Sports Medicine

Dependence of Biochemical Health Markers on the Level of Sports Skills in the Puberty
Chirkin A., Altani M., Stepanova N., Chirkina A.87

New Technologies

in Laboratory Diagnostics
Translational Laboratory Medicine: Prediction of the Complicated Course of Acute Coronary Syndrome Using Innovative Technologies of Assessment of the Coupling of Antioxidant Protection Processes, Proteo- and Phospholipolysis
Kamyshnikov V., Yakovlev-Malykh N., Litvinko N., Sviridov O., Dubovskaya L., Yuraga T., Borisenko T.98

Evaluation of the Protective Reaction of the Lipid Structures of Blood Serum and Spermoplasm to the Effect of the Factor that Initiates the State of Oxidative Stress
Pekhtserava N., Kamyshnikov V., Kharavets A., Zhukovets T.116

Laboratory Diagnostic Technology for Simultaneous Determination in a Sample of the Analyzed Material (Tissue, Biological Fluid) of Homocysteine and Other Physiologically Active Amino thiols Using Highly Efficient Liquid Chromatography
Doroshenko Ye., Novogradskaya Ya.135

Request for Discussion

Discussion of the Problem of "Normal" Values: Comparative Analysis of Cell Composition of Blood and the Level of Blood Serum Proteins in Sporadic and Regular Donors
Taganovich A., Kauhanka N., Prohorova V., Got'ko O., Levandovskaya O.144

Allergic Reaction to β -lactam Antibiotics – Carbapenems (Literature Review and Clinical Case Report)
Laptcevich A., Kandaaurava S., Lipnitski A.155

DOI: <https://doi.org/10.34883/PI.2020.9.1.034>
УДК 577.112.3:543.632.522]:611.018:543.544.5

Дорошенко Е.М., Новгородская Я.И.
Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Doroshenko Ye., Novogrodskaya Ya.
Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

Лабораторно-диагностическая технология одновременного определения в пробе анализируемого материала (ткани, биологической жидкости) гомоцистеина и других физиологически активных аминотиолов с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии

Laboratory Diagnostic Technology for Simultaneous
Determination in a Sample of the Analyzed Material
(Tissue, Biological Fluid) of Homocysteine and Other
Physiologically Active Amino thiols Using Highly
Efficient Liquid Chromatography

Резюме

Введение. Существующие методы определения гомоцистеина в плазме (сыворотке) крови не могут быть использованы для определения в тканях из-за их недостаточной разрешающей способности.

Цель. Разработать способ одновременного определения гомоцистеина и других биологически важных аминотиолов в тканях, пригодный также для биологических жидкостей.

Материалы и методы. Обращенно-фазная высокоэффективная жидкостная хроматография с предколоночной дериватизацией, градиентным элюированием и детектированием по флуоресценции. Пробоподготовка: восстановление аминотиолов в гомогенатах тканей трис(2-карбоксиветил)фосфин гидроклоридом и дериватизация аммоний-7-фторбензол-2-оксо-1,3-диазола-4-сульфонатом.

Результаты и обсуждение. Предложен новый способ параллельного определения в пробах анализируемого биологического материала основных представителей низкомолекулярных аминотиолов – гомоцистеина (Hcy), цистеина (Cys), цистеинилглицина (CysGly), гамма-глутамилцистеина (γ GluCys) и глутатиона (GSH), пригодный для их определения в тканях. Оптимизированная селективность системы (рН и ионная сила буфера в подвижной фазе, температура

и профиль градиента) позволила уверенно детектировать Hcy и основные аминокислоты тканей крыс. Метод может быть использован при проведении исследований в области экспериментальной медицины и биохимии.

Заключение. Разработанный способ определения низкомолекулярных тиолсодержащих соединений в тканях методом ВЭЖХ с детектированием по флуоресценции после предколоночной дериватизации является воспроизводимым, чувствительным и пригодным для использования в экспериментальных и клинико-биохимических исследованиях.

Ключевые слова: аминокислоты, гомоцистеин, ткани, высокоэффективная жидкостная хроматография.

Abstract

Introduction. The existing methods of determination of blood plasma homocysteine cannot be applied for tissue samples due to insufficient resolution.

Purpose. To develop a method for simultaneous determination of homocysteine and other biologically important aminothiols in tissues, which would be also suitable for biological fluids.

Materials and methods. Reversed-phase high performance liquid chromatography with pre-column derivatization followed by gradient elution and fluorescence detection. Sample preparation: reduction of aminothiols in the homogenates of tissues with tris(2-carboxyethyl)phosphine and derivatization with 7-fluorobenzofurazan-4-sulfonic acid ammonium salt.

Results and discussion. We developed a new method for quantitative measurement of low-molecular weight aminothiols – homocysteine (Hcy), cysteine (Cys), cysteinylglycine (CysGly), gamma-glutamylcysteine (γ GluCys), and glutathione (GSH) with resolution high enough for their determination in tissues. The optimized selectivity of the chromatographic system (pH and ionic strength of the buffer in mobile phase, temperature and profile of the gradient) let to detect the main aminothiols of rat tissues. The described method can be used in studies in the field of experimental medicine and biochemistry.

Conclusion. The proposed method for determination of low molecular weight thiol-containing compounds in tissues with HPLC method with fluorescence detection after pre-column derivatization is reproducible, sensitive and suitable for use in experimental and clinical biochemical studies.

Keywords: aminothiols, homocysteine, tissues, highly effective liquid chromatography.

■ ВВЕДЕНИЕ

Гомоцистеин (Hcy), а также промежуточные продукты гамма-глутамильного цикла играют важную роль в обмене серосодержащих соединений, процессах транспорта и биотрансформации веществ. По содержанию этих веществ можно судить о скорости протекания ряда метаболических процессов. Уровни низкомолекулярных аминокислот в тканях и биологических жидкостях организма могут являться показателями метаболических нарушений при ряде форм патологии. Однако количественное определение соединений, относящихся к низкомолекулярным аминокислотам, в тканях является очень трудной задачей, решение которой весьма важно для установления патохимических изменений в организме при многих заболеваниях.

В литературе встречается достаточно много работ, посвященных определению низкомолекулярных аминокислот в биологических жидкостях человека и животных [1–9], но крайне мало – в тканях.

Первые попытки определения Hcy в тканях животных были приняты Ueland P.M., Helland S., Broch O.J., Schanche J.S. в 1984 году. Ими описан хроматографический метод определения Hcy в тканях: печени, почках, мозге, сердце, легких и селезенке мышей и крыс. Метод отличается большой сложностью, поскольку в его основе лежит радиометрическое определение Hcy по радиоактивности меченого S-аденозилгомоцистеина (AdoHcy), для образования которого сначала требуется проведение адсорбции аденозина и эндогенного AdoHcy в экстракте ткани углем, покрытым декстраном; при этом Hcy остается в растворе. Затем Hcy конденсировали с радиоактивным аденозином, а метка AdoHcy количественно определялась с помощью обращенно-фазной ВЭЖХ [10].

Guan X.C. с соавт. пытались детектировать низкомолекулярные тиолсодержащие соединения: цистеин (Cys), Hcy и глутатион (GSH) в мозге, легких, сердце, почках, эритроцитах и плазме крови крыс методом ВЭЖХ с масс-спектрометрией. В гомогенаты, приготовленные на хлориде калия, добавляли этиловый эфир GSH и реактив Элмана. Белки осаждали сульфосалициловой кислотой.

Авторы подчеркивают большую чувствительность данного метода по сравнению с ВЭЖХ с УФ-детектированием: метод имел одинаковую или большую чувствительность по сравнению с таковым, основанным на ВЭЖХ с флуоресцентным/электрохимическим детектированием или на использовании капиллярного электрофореза. Однако Hcy был уверенно обнаружен только в мозге, плазме и эритроцитах: предположено, что в других тканях он находился в концентрации ниже предела обнаружения данного метода [11].

Поскольку авторы не восстанавливали дисульфиды, результаты применения метода не позволяют судить о полной концентрации соответствующих тиолов, так как большая часть аналитов будет присутствовать в виде дисульфидов различного состава, существенно усложняя интерпретацию результатов. Однако констатированный уровень Hcy даже в плазме крови крыс (115 ± 146 ммоль/л) вызывает сомнения, так как многочисленные работы указывают на его более низкие значения [12–14].

Kamińska A. с соавт. предложили простой, быстрый, точный и дешевый, по их мнению, метод одновременного определения общего Cys, Hcy, GSH и N-ацетилцистеина (NAC) в гомогенатах мозга свиньи, основанный на восстановлении дисульфидных связей трис(2-карбоксиитил) фосфин гидрхлоридом, с предколоночной дериватизацией свободных тиоловых групп тетрафторборатом 2-хлор-1-метилхинолина и последующим разделением ион-парной ВЭЖХ на обращенной фазе с УФ-детектированием [15]. Метод, однако, не воспроизводился на других тканях, в частности в печени, характеризующейся весьма высокой интенсивностью обмена серосодержащих соединений.

Все перечисленные хроматографические методы характеризуются трудоемкостью, сложностью и длительностью процедуры, что затрудняет их использование в биомедицинских исследованиях. Однако основным ограничением является разрешающая способность методов, которая затрудняет их использование для проб тканей, так как спектр соединений родственной структуры в тканях значительно шире, чем в биологических жидкостях.

Беленичев И.Ф. с соавт. определяли уровень Нсу в гомогенате ткани мозга крыс иммуноферментным методом с помощью стандартного тест-набора производства PLIVA-Lachema Diagnostika в соответствии со стандартной процедурой. Однако, поскольку этот набор реагентов предназначен для определения Нсу в сыворотке крови, корректность получаемых результатов требует дальнейшей проверки. Уровень Нсу в гомогенатах мозга ложнооперированных крыс, составивших контрольную группу, – $5,6 \pm 0,52$ ммоль/г ткани [16] – представляется нам сильно завышенным.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка способа определения Нсу одновременно с возможно более широким кругом других тиолсодержащих соединений в тканях, с возможностью использования его и для биологических жидкостей.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы

В работе использовали ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ (Sigma-Aldrich, США), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Panreac, Испания), ЭДТА (НТПК «Анализ-Х», Беларусь), трис(2-карбоксииэтил)фосфин гидрохлорид (ТСЕР) (Aldrich, США), аммониевую соль 7-фторбензофуразан-4-сульфоновой кислоты (SBD-F) (Sigma, США), стандарты L-цистеина, L-гомоцистеина, цистеинилглицина (CysGly), γ -глутамилцистеина (γ GluCys), глутатиона (Sigma, США), N-ацетилцистеин (Белмедпрепараты, Беларусь), трихлоруксусную кислоту (Panreac, Испания) и другие реактивы квалификации не ниже «хч». Трижды дистиллированную воду фильтровали через мембранный фильтр Millipore GV с размером пор 0,22 мкм.

Оборудование и программное обеспечение

Использовали одноканальные дозаторы переменного объема серии Лайт (Ленпипет, Россия) объемами 10–100 и 100–1000 мкл, лабораторный шейкер MS 3 basic (Ika, Германия), аналитические весы AR 2140 (Ohaus, Китай), pH-метр HI 931400 (Hanna Instruments, Германия), центрифугу Heraeus Biofuge Primo R+ (Thermo Scientific, США), водяную баню (Daihan Scientific, Южная Корея).

Жидкостный хроматограф Agilent 1200 (Agilent Technologies, США) включал 4-канальную систему подачи растворителя с вакуумным дегазатором G1311A, термостатируемый автосамплер G1329A, термостат колонок G1316A, детектор флуоресценции G1321C.

Идентификация веществ и количественная обработка хроматограмм производилась программой Agilent ChemStation C.01.05 по методу внутреннего стандарта. Калибровочные коэффициенты определяли по смеси стандартов определяемых веществ, которая обрабатывалась так же, как соответствующие пробы ткани.

Приготовление стандартов

Для калибровки хроматографической системы из сухих стандартов готовили водные растворы Нсу, Cys, CysGly, γ GluCys и GSH концентрации

10 ммоль/л. Затем из этих растворов готовили смесь, которую доводили водой до концентрации 100 мкмоль/л (нмоль/г ткани).

Приготовление рабочих реактивов

Среду для гомогенизации готовили на основе 0,15 моль/л раствора KCl, в который ежедневно вносили 240 мг TCEP на 20 мл раствора KCl и 82 мкл 0,4% раствора NAC.

Раствор SBD-F готовили ежедневно, 1 мг SBD-F растворяли в 1 мл 0,125 моль/л Na-боратного буфера (pH 9,5).

Пробоподготовка

Наиболее близким к заявляемому методу является метод определения Hсу в биологических жидкостях [17]. За основу был взят его этап пробоподготовки.

Для отработки метода использовали образцы тканей, замороженных в жидком азоте. Пробы тканей гомогенизировали в среде для гомогенизации в соотношении 1:5 (масса/объем) и оставляли при комнатной температуре на 30 мин. для восстановления аминотиолов [18]. Осаждали белки 10% раствором трихлоруксусной кислоты, пробы центрифугировали при 4 °С 15 мин. при 16 000 g и выполняли дериватизацию. Для дериватизации в микропробирку, содержащую 4 мкл 1,55 моль/л NaOH, 25 мкл 0,125 моль/л Na-боратного буфера (pH 9,5) и 10 мкл раствора SBD-F [19], добавляли 20 мкл супернатанта, инкубировали 1 час при 60 °С. В хроматографическую систему вводили 20 мкл реакционной смеси. Смесь стандартов обрабатывали аналогичным способом.

Высокоэффективная жидкостная хроматография с детектированием по флуоресценции

Определение Hсу в тканях с использованием условий хроматографического разделения, оптимизированных для плазмы крови [17], невозможно ввиду интерференции пиков неизвестных компонентов пробы и пика Hсу. Для элюирования веществ, соответствующих пикам Cys и Hсу, требуется весьма низкая концентрация органического модификатора, поэтому, чтобы получить удерживание Hсу, достаточное для его четкого разделения, требуется сорбент, допускающий низкие (нулевые) концентрации органического модификатора. Нами использован сорбент Zorbax SB C₁₈ (размер частиц 3,5 мкм). Разделение осуществляли с градиентным элюированием, используя две колонки 2,1×150 мм в tandemном включении с целью получения максимальной эффективности.

Состав подвижной фазы: 0,1 моль/л NaH₂PO₄, 17,4 ммоль/л H₃PO₄, 40 мг/л ЭДТА (А), ацетонитрил/вода 7/3 (об/об) (В). Скорость потока 0,2 мл/мин, температура колонки 29 °С. Элюирование проводили по следующей программе: 0 мин. – 0% В, 26 мин. – 0% В, 47 мин. – 15% В, 53 мин. – 25% В. Детектирование по флуоресценции, 379/510 нм.

Результаты выражали в нмоль определяемых веществ на 1 г массы образца (влажной ткани). Для этого концентрацию стандартов в их растворе, используемом для калибровки (100 мкмоль/л каждого), принимали за 100 нмоль/г. Данную смесь подвергали полной процедуре пробоподготовки.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подвижная фаза в начале анализа – Na-фосфатный буфер без органического модификатора. Это дает возможность:

- 1) использовать подвижную фазу с низкими значениями pH (ниже 3,5);
- 2) достичь существенно большего удерживания пика Hcy, что важно для обеспечения разрешения пиков с пиками interfering соединений;
- 3) обеспечить высокую эффективность разделения (малую ширину пиков).

Удовлетворительного разрешения пика Hcy от interfering пиков в данных условиях удалось достичь при использовании 0,1 моль/л Na-фосфатного буфера с величиной pH около 3,5 (доводится добавлением ортофосфорной кислоты до наилучшего разделения пика гомоцистеина) и с применением длительного изократического этапа перед началом градиента ацетонитрила. Использование изократического элюирования невозможно, так как время удерживания внутреннего стандарта значительно превышает 1 час. Типичная хроматограмма смеси стандартов приведена на рис. 1.

На рис. 2 и 3 представлена хроматограмма гомогената печени крысы. Видно, что эта ткань богата соединениями, дериватирующимися с SBD-F в описанных условиях, т. е. содержащими тиольную группу. Большинство из них в данной системе выходят пиками с достаточно хорошим разрешением (неидентифицированные соединения обозначены

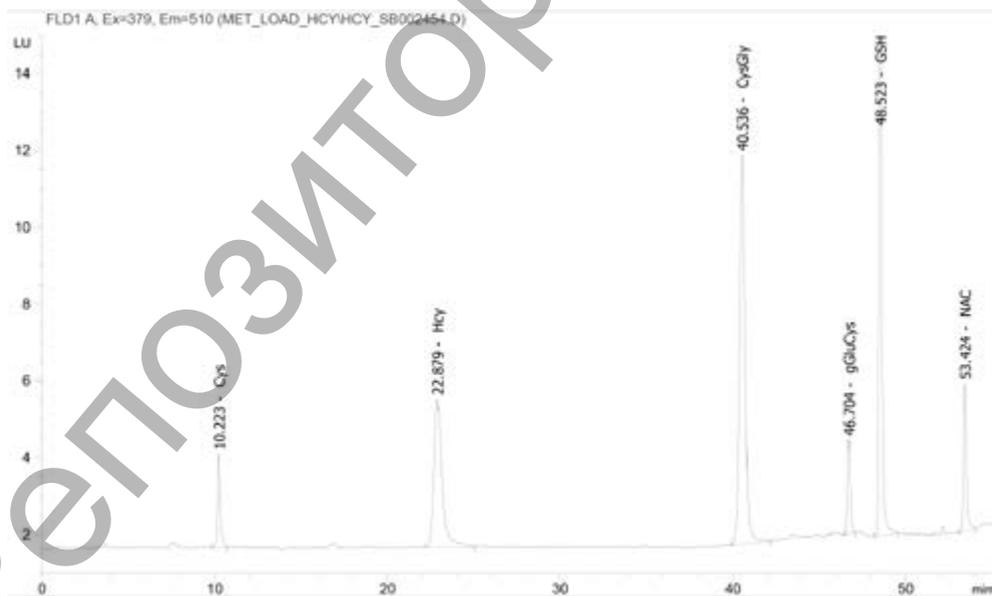


Рис. 1. Хроматограмма стандартов Cys, Hcy, CysGly, γGluCys и GSH для их определения в тканях

Fig. 1. Chromatogram of standards of Cys, Hcy, CysGly, γGluCys, and GSH for their determination in tissues

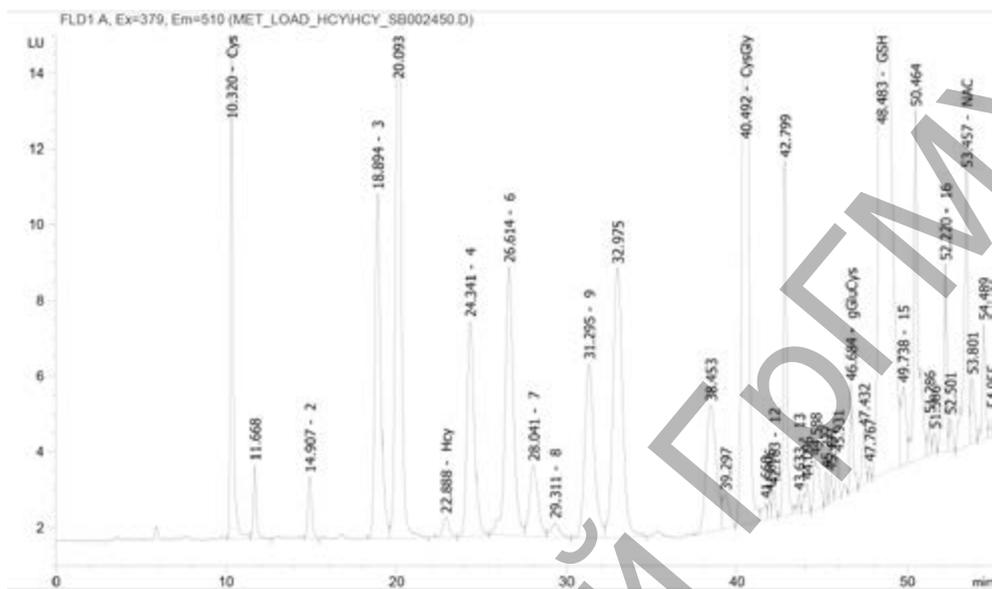


Рис. 2. Хроматограмма общего Cys, Hcy, CysGly, γGluCys и GSH печени крыс

Fig. 2. Chromatogram of total Cys, Hcy, CysGly, γGluCys, and GSH in rat liver

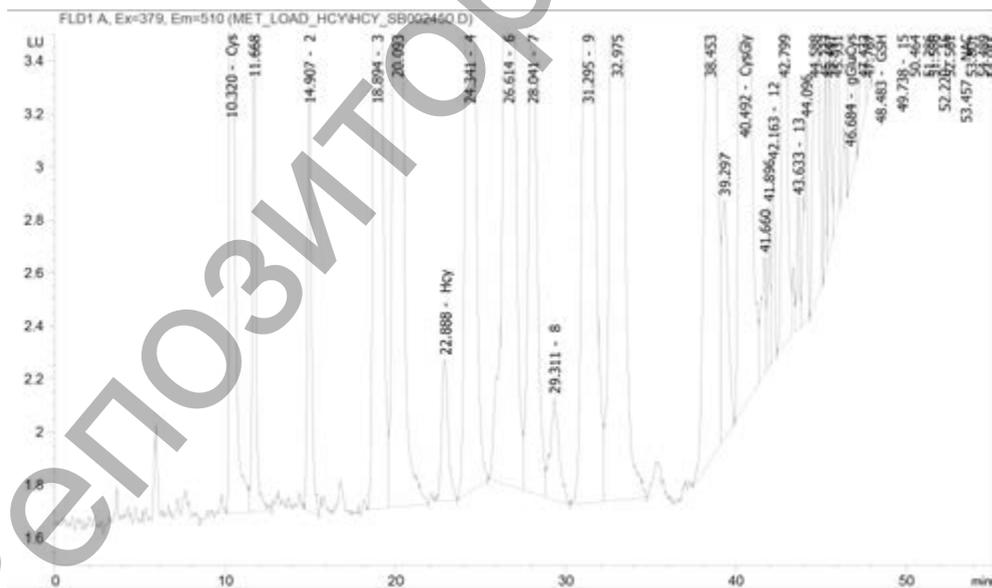


Рис. 3. Та же хроматограмма, что и на рис. 2, в более крупном масштабе. Отчетливо виден пик Hcy

Fig. 3. Larger-scale chromatogram from fig. 2. Hcy peak is clearly visible

цифрами). Уровень Hcy, пик которого имеет хорошее разрешение от интерферирующих пиков, в тканях является весьма низким.

Для подтверждения надежности определения Hcy данным способом в отдельной серии опытов нами был определен аналитический выход Hcy с использованием метода добавления стандарта. Пробу печени делили на 2 части, к одной из которых добавляли внесенную в среду для гомогенизации смесь стандартов Cys, GSH и Hcy в концентрации, соответствующей 50 нмоль/г ткани, к другой – эквивалентное количество воды.

Аналитический выход определяли как разность полученных уровней веществ в обеих частях пробы, которую сравнивали с калибровочной кривой с учетом внутреннего стандарта и выражали в процентах от добавленного количества. Аналитический выход составил (n=10): для Cys – 97,3±15,1%; для Hcy – 103,7±4,9%; для GSH – 95,5±14,0%. Это означает, что в процессе пробоподготовки не происходит существенных потерь аналитов и уровней Hcy, определяемых в ходе исследования.

Апробация способа

Данный способ был апробирован на образцах ткани печени крыс. Показатели содержания (средние значения со средними ошибками) анализируемых компонентов в печени крыс составили: для Cys 286,71±54,697, Hcy – 1,16±0,168, CysGly – 82,02±8,509, γ GluCys – 28,79±4,10 нмоль/г, а медиана и нижняя и верхняя квартили для GSH – 1813,50 [1559,94; 1931,21] нмоль/г. Эти данные существенно ниже приведенных в работах отдельных авторов [10, 15], что свидетельствует о том, что указанные методы не свободны от интерференций, а реальный уровень Hcy в печени сравним или ниже, чем в крови.

Для исследования предложенным способом биологических жидкостей (плазма/сыворотка крови) применения двух колонок в tandemном включении не требуется. Для разделения на одной колонке используется градиентное элюирование: 0 мин. – 0% B, 4 мин. – 5,3% B, 14,5 мин. – 9,8% B, 18 мин. – 20% B. Остальные параметры, а также состав подвижных фаз те же, что и в методе для выполнения определений в тканях. Пробоподготовка полностью аналогична [17].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенный способ определения низкомолекулярных тиолсодержащих соединений в тканях методом ВЭЖХ с детектированием по флуоресценции после предколоночной дериватизации является воспроизводимым, чувствительным и пригодным для использования в экспериментальных и клинико-биохимических исследованиях.

В отличие от других, описанных в литературе методов, заявляемый способ позволяет одновременно детектировать ряд биологически важных соединений: общий гомоцистеин и цистеин, цистеинилглицин, гамма-глутамилцистеин и глутатион. Кроме этого, преимуществами данного метода являются:

- 1) высокое разрешение, благодаря чему определение гомоцистеина возможно в такой сложной матрице, как гомогенат печени;
- 2) отсутствие при пробоподготовке реакций с участием аналитов, катализируемых ферментами (SAH-гидролаза);

- 3) химический принцип дериватизации с SBD-F, который широко используется для определения гомоцистеина в крови; его надежность не вызывает сомнений.

Участие авторов

Концепция и дизайн исследования, выполнение определений, редактирование – Дорошенко Е.М.; концепция и дизайн исследования, подготовка биологического материала, написание текста – Новоградская Я.И.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Chen W., Zhao Y., Seefeldt T., Guan X. (2008) Determination of thiols and disulfides via HPLC quantification of 5-thio-2-nitrobenzoic acid. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 48, pp. 1375–1380.
- Ling Y.-Y., Yin X.-F., Fang Z.-L. (2005) Simultaneous determination of glutathione and reactive oxygen species in individual cells by microchip electrophoresis. *Electrophoresis*, vol. 26, pp. 4759–4766.
- Inoue T., Kirchhoff J.R. (2002) Determination of thiols by capillary electrophoresis with amperometric detection at a coenzyme pyroloquinoline quinone modified electrode. *Anal. Chem.*, vol. 74, pp. 1349–1354.
- Yang S., Jiang W., Ren L., Yuan Y., Zhang B., Luo Q., Guo Q., Bouchard L.S., Liu M., Zhou X. (2016) Biothiol xenon MRI sensor based on thiol-addition reaction. *Anal. Chem.*, vol. 88, no 11, pp. 5835–5840.
- Nikitin D., Dutov A., Rudakova L. (2017) Ekstraktsionno-khromatograficheskoe opredelenie serosoderzhashchikh aminokislot v biologicheskikh zhidkostiakh [Extraction-chromatographic determination of sulfur containing amino acids in biological fluids]. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, vol. 17, no 4, pp. 574–583.
- Yin C., Huo F., Zhang J., Martínez-Máñez R., Yang Y., Lv H., Li S. (2013) Thiol-addition reactions and their applications in thiol recognition. *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no 14, pp. 6032–6059.
- Wang J., Liu H.-B., Tong Z., Ha C.-S. (2015) Fluorescent/luminescent detection of natural amino acids by organometallic systems. *Coord. Chem. Rev.*, vol. 303, pp. 139–184.
- Jun M.E., Roy B., Ahn K.H. (2011) Turn-on fluorescent sensing with "reactive" probes. *Chem. Commun.*, vol. 47, pp. 7583–7601.
- Xu Y., Zhang Y., Tang B., Laskin J., Roach P.J., Chen H. (2010) Study of highly selective and efficient thiol derivatization using selenium reagents by mass spectrometry. *Anal. Chem.*, vol. 82, no 16, pp. 6926–6932.
- Ueland P.M., Helland S., Broch O.J., Schanche J.S. (1984) Homocysteine in tissues of the mouse and rat. *J. Biol. Chem.*, vol. 259, no 4, pp. 2360–2364.
- Guan X., Hoffman B., Dwivedi C., Mathees D.P. (2003) A simultaneous liquid chromatography/mass spectrometric assay of glutathione, cysteine, homocysteine and their disulfides in biological samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 31, no 2, pp. 251–261.
- Alisievitch S., Dubichev A., Levina A., Nazarova G., Zolotov N., Krzhechkovskaya V., Pavlova N., Romanova E., Rudko I., Cherkasova K., Kubatiev A. (2006) Stress induced platelet dysfunction in rats with folic acid-deficient hyperhomocysteinemia. *General Reanimatology*, vol. 2, no 6, pp. 61–65.
- Nikolic T.T., Arsic A., Vucic V., Petrovic S., Ristic-Medic D., Zivkovic V., Srejsovic I., Jeremic J., Radonjic T., Milosavljevic I., Bolevich S., Bolevich S., Djuric D., Jakovljevic V. (2019) Hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors differentially modulate plasma fatty acids in rats with diet-induced hyperhomocysteinemia: is ω-3 fatty acids supplementation necessary? *Front Physiol.*, vol. 10, no 892, pp. 1–9.
- Baranovicova E., Kalenska D., Tomascova A., Lehotsky J. (2018) Metabolomic study of altered energy metabolism during global forebrain ischemia and ischemic preconditioning in blood plasma in homocysteine treated rats. *J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 69, no 6. doi: 10.26402/jpp.2018.6.04.
- Kamińska A., Olejarsz P., Borowczyk K., Glowacki R., Chwatko G. (2018) Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, glutathione, and N-acetylcysteine in brain homogenates by HPLC. *J. Sep. Sci.*, vol. 41, no 16, pp. 3241–3249.
- Belenichev I., Gorbacheva S., Demchenko A., Bukhtiyarova N. (2014) The thiol-disulfide balance and the nitric oxide system in the brain tissue of rats subjected to experimental acute impairment of cerebral blood flow: The therapeutic effects of nootropic drugs. *Neurochemical Journal*, vol. 8, no 1, pp. 24–27.
- Doroshenko E., Snezhitskij V., Lelevich V. (2017) Struktura pula svobodnykh aminokislot i ikh proizvodnykh plazmy krovi u patientsov s ishemijskoi bolezn'iu serdtsa i proiavleniyami khronicheskoi serdechnoi nedostatocnosti [Structure of the pool of free amino acids and their derivatives in plasma of patients with ischemic heart disease and chronic cardiac insufficiency]. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*, vol. 15, no 5, pp. 551–556.
- Gilfix B.M., Blank D.W., Rosenblatt D.S. (1997) Novel reductant for determination of total plasma homocysteine. *Clinical Chemistry*, vol. 43, pp. 687–688.
- Ubbink J.B., Hayward Vermaak W.J., Bissbort S. (1991) Rapid high-performance liquid chromatographic assay for total homocysteine levels in human serum. *J. Chromatogr.*, vol. 565, no 1–2, pp. 441–446.

Поступила/Received: 19.12.2019
Контакты/Contacts: dgi03@mail.ru