

Ензиматичний метод визначення вмісту L-аргініну за використання рекомбінантної аргінази I людини

Н.С. Стасюк^{1,2*}, Г.З. Гайда¹, А.В. Гайда¹, М.В. Гончар¹, Є.П. Ковальчук²

¹ Інститут біології клітини НАН України
вул. Драгоманова, 14/16, Львів, 79005, Україна

² Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Кирила і Мефодія, 6/8, Львів, 79005, Україна

Резюме. Розроблено ензиматично-спектрофотометричний метод визначення вмісту L-аргініну за використання аргінази I людини, виділеної з рекомбінантних дріжджів *Hansenula polymorpha*. Метод є селективним і простим у виконанні. Лінійність зберігається в межах 0,007–0,1 мМ L-аргініну в реакційній суміші, а його порогова чутливість — 0,005 мМ. Метод апробовано на реальних зразках комерційних фармацевтичних препаратів, що містять L-аргінін, показано високу кореляцію результатів у порівнянні з даними виробника, а також із референтним хімічним ($R=0,998$) та іншими методами.

Ключові слова: L-аргінін, аргіназа I, ензиматичний метод, діацетил-(2,3-бутандіон) монооксим.

Вступ. Аргіназа (КФ 3.5.3.1; L-аргінін-амідиногідролаза) відіграє вирішальну роль у гідролітичному розщепленні L-аргініну (L-Arg) до L-орнітину і сечовини. В організмі людини присутні дві ізоформи цього ферменту: аргіназа I (знаходиться в цитоплазмі клітин печінки) функціонує в циклі сечовини й аргіназа II (локалізована в мітохондріях деяких тканин організму людини, особливо в клітинах нирок), яка регулює співвідношення аргінін/орнітин у клітині та не бере участі в циклі сечовини [1–4]. В останні роки встановлено, що аргіназа I може служити ефективним протипухлинним засобом в ензимотерапії деяких видів раку [5–8], спричиняючи голодування за L-Arg ракових клітин, передусім гепатокарциноми і меланоми. Для контролю такої ензимотерапії необхідним є постійний контроль вмісту L-Arg у крові.

Іншою важливою галуззю, де існує необхідність моніторингу L-Arg, є харчова промис-

ловість. У харчових продуктах, зокрема винах, під дією мікроорганізмів може утворюватись канцерогенний етилкарбамат — кінцевий продукт перетворення L-Arg до сечовини і конденсації останньої з етанолом за умов пастеризації [9].

На сьогодні описано багато методів визначення L-Arg, зокрема іонообмінна хроматографія [10, 11], капілярний електрофорез [12], полярографія [13], високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) [14], біосенсорні методи [15–19] і спектрофотометрія [20]. На жаль, ці підходи потребують дорогого спеціального обладнання і операторів високої кваліфікації, що ускладнює широке впровадження цих методів у практику.

Перші спроби колориметричного (спектрофотометричного, СФ) визначення L-Arg обмежувались реакцією Сакагучі [21] із α -нафтолом і натрій гіпохлоритом. У подальших модифікаціях цього методу застосовували хромогенні агенти: діацетил- α -нафтол [22], 2-метил- α -нафтол [23], 5-хлоро-7-йодо-8-гідроксихінолін [24], α -нафтол і діацетил-(2,3-бутандіон) монооксим (метод Вогес-Проскауера) [25], тимол-(2-пропіл-5-метил)фенол і натрій гіпобро-

* Corresponding author.

Tel: +38097-8084622

E-mail address: stasuk_natalia@ukr.net

міт [20]. Описано чутливий метод за використання 8-гідроксихіноліну та натрій гіпоброміту [26], лінійний діапазон концентрацій визначення L-Arg цим методом — 1,5-12 мкг/мл.

Недоліком усіх зазначених СФ-методів є низька селективність, спричинена позитивною реакцією на гуанідинові сполуки. Застосування СФ-методів визначення L-Arg у біологічних рідинах (плазмі й сечі) обмежується тим, що на точність вимірювань можуть впливати відносно високі концентрації деяких інших амінокислот — лізину, проліну, цитруліну тощо [7]. Розроблено чутливий проточно-інжекційний ВЕРХ-метод, що базується на взаємодії L-Arg із натрій гіпобромітом з утворенням хемілюмінесцентного продукту [27]: лінійний діапазон визначення L-Arg цим методом знаходиться в широкому діапазоні концентрацій (2,5-100 мкМ), нижня межа визначення — 0,1 мкМ. Варто відмітити, що критичним моментом СФ і хемілюмінесцентної стадії реакції є низька стабільність гіпоброміту натрію.

L-Arg у реальних біологічних рідинах можна відокремлювати від інтерферуючих сполук, застосовуючи іонообмінні смоли [28], проте це ускладнює процедуру аналізу.

Таким чином, більшість відомих методів визначення L-Arg має низку недоліків, основні з яких: низька селективність (хімічні методи), громіздкість і висока вартість апаратури (фізико-хімічні методи), недостатня стабільність (операційна й при зберіганні) та чутливість до інтерферуючого впливу супутніх речовин. З огляду на це розробка нових високоселективних і чутливих методів визначення вмісту L-Arg, зокрема ензиматичних, є дуже актуальною.

Для ензиматичного аналізу L-Arg запропоновано використання трьох ферментів — аргінази, уреазы та глутаматдегідрогенази [29] або октопін дегідрогенази [30]. Чутливість мультиферментного методу — 2 мкМ L-Arg, лінійний діапазон визначення — до 0,47 мМ [29]. Недоліком цих методів є висока вартість аналізу, обумовлена використанням кількох комерційних ферментів.

Отже, на сьогодні проблему ферментативного визначення L-Arg ще не вирішено, тому дослідження в цьому напрямі, особливо створення комерційно вигідних ензиматичних

тест-систем за використання ферментів, селективних до цієї амінокислоти, є актуальним завданням аналітичної біотехнології. Найперспективнішими для розробки таких методів є ферменти метаболізму аргініну, зокрема аргіназа I, аргінін деіміназа, аргінін декарбоксилаза.

У результаті попередніх досліджень в Інституті біології клітини НАН України сконструйовано рекомбінантний штам-продуцент аргінази I печінки людини на базі термотолерантних метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha* [31]. Оптимізовано умови культивування клітин продуцента і розроблено прості й економічно вигідні технології одержання високоочищених препаратів аргінази I з цього штаму [32, 33] та інших рекомбінантних штамів дріжджів [34]. Препарат аргінази I, виділений із рекомбінантних клітин *H. polymorpha*, застосовано для іммобілізації на наночастицях [35, 36], а також для конструювання біосенсорів на L-Arg [37-39].

Метою нашого дослідження було розроблення ензиматичного методу аналізу L-Arg на основі аргінази I печінки людини, виділеної з клітин рекомбінантного штаму дріжджів *H. polymorpha*, а також оцінювання нового методу в порівнянні з відомим хімічним методом аналізу та іншими методами.

Матеріали і методи дослідження. Як продуцент аргінази I печінки людини використовували рекомбінантний штам дріжджів NCYC 495 *H. polymorpha* pGAP1-HsARG1 leu2car1:LEU2(S. c). Штам містить цільовий ген *HsARG1* під контролем конститутивного промотора гена гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази [31].

Фермент виділяли із безклітинного екстракту штаму-продуцента шляхом афінної колонкової хроматографії за розробленою нами схемою [32].

Активність аргінази визначали за швидкістю утворення сечовини [32]. Концентрацію сечовини визначали в хімічній реакції за інструкцією до набору для визначення сечовини виробництва НВФ «СІМКО», Львів [40]. Розчин ферменту з питомою активністю 600 мкмоль · хв⁻¹ · мг⁻¹ (600 Од./мг) було використано для розробки ензиматичного методу аналізу L-Arg.

Референтний хімічний метод аналізу L-Arg

виконували з використанням 8-гідроксихіноліну [26]. Стандартний розчин 0,1 М L-Arg отримували розчиненням наважки L-Arg гідрохлориду («Sigma-Aldrich») у воді з подальшим розведенням водою до потрібної концентрації. Розчин натрій гіпоброміту готували шляхом розведення бромиду (0,68 мл) у 1 л 5%-ого розчину натрій гідроксиду та зберігали в темноті при +4 °С до двох діб.

У роботі аналізували такі зразки фармацевтичних препаратів: «Тівортін» (Юрія-Фарм, Україна), «Цитраргінін» (Laphal Industria, Франція) і «Аміноплазмаль 10% Е» (Mr Brown Melzunhen AG, Німеччина). Усі досліджувані реальні зразки зберігали при -20 °С.

Аналіз проводили за такою схемою: у скляні пробірки відбирали по 0,1 мл розведених у 30 мМ Трис-НСІ буфері, рН 8,8 (ТБ) досліджуваних проб, а для побудови калібрувального графіка — по 0,1 мл стандартних розчинів L-Arg у ТБ. Реакцію запускали додаванням 0,01 мл розчинів аргінази I у ТБ із вихідними концентраціями 16,5; 33,0; 49,5 та 66,0 Од./мл. Інкубаційну суміш перемішували та витримували при 37 °С протягом фіксованого часу. Далі в суміш вносили 1,7 мл розчину діацетил-(2,3-бутандіон) монооксиму (ДМО) у 10 % сульфатній кислоті і кип'ятили на водяній бані протягом 10-50 хв. СФ-методом при 480 нм реєстрували оптичну густину кінцевого кольорового продукту реакції проти «сліпої» проби (0,1 мл ТБ замість дослідної проби). Концентрацію L-Arg у фотометрованому зразку визначали

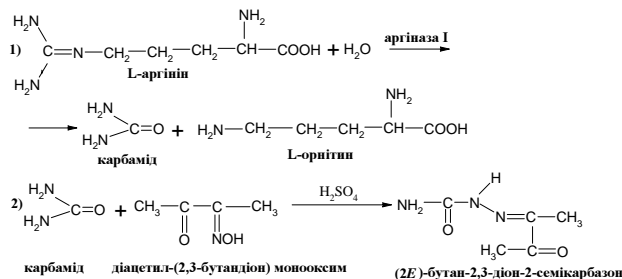


Рис. 1. Загальна схема реакцій при ензиматичному визначенні L-Arg.

методом множинних внесень стандарту за калібрувальним графіком [41]. Результати досліджень обробляли статистично.

Результати й обговорення. Запропонований нами метод ґрунтується на ферментативному гідролізі L-Arg до L-орнітину і карбаміду (I стадія реакції, ензиматична). Карбамід за умов прогрівання в кислому середовищі взаємодіє із ДМО (II стадія, хімічна) з утворенням кольорового продукту. Реакційна суміш набуває забарвлення (від світло-жовтого до насиченого оранжевого, залежно від вихідної концентрації L-Arg), яке кількісно оцінюється фотометрично при 480 нм [42].

Принципова схема реакцій, що лягли в основу методу визначення L-Arg, представлена на рис. 1. Кінцевим продуктом хімічної реакції (друга стадія) є (2E)-бутан-2,3-діон-2-семікарбазон та інші сполуки, зокрема циклічні [43-45].

Для розроблення ензиматичного методу аналізу L-Arg і забезпечення його надійності

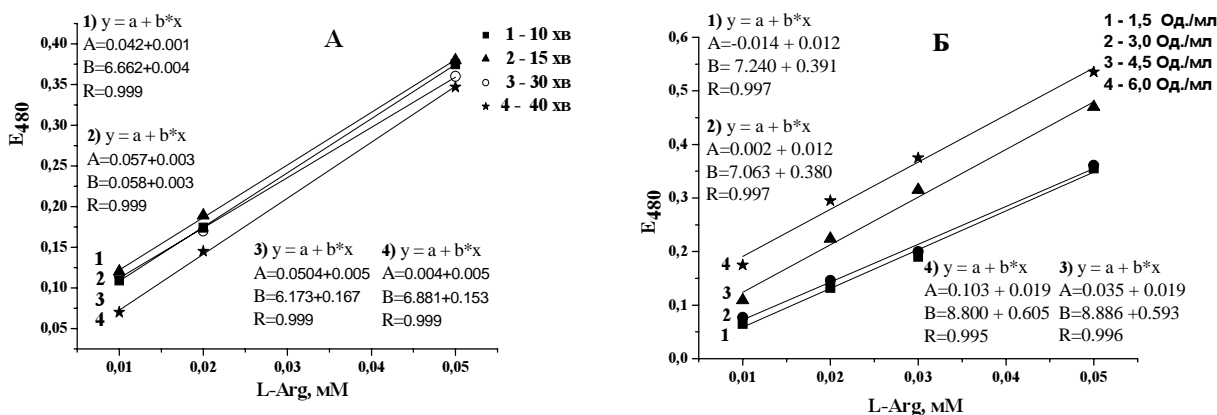


Рис. 2. Залежність аналітичного сигналу від умов проведення ензиматичної стадії аналізу: **А** — час інкубації (10-40 хв), 4,5 Од./мл аргінази I в інкубаційній суміші; **Б** — концентрація ферменту (1,5-6,0 Од./мл) в інкубаційній суміші. Концентрація ДМО в реакційній суміші для **А** і **Б** — 0,5 %.

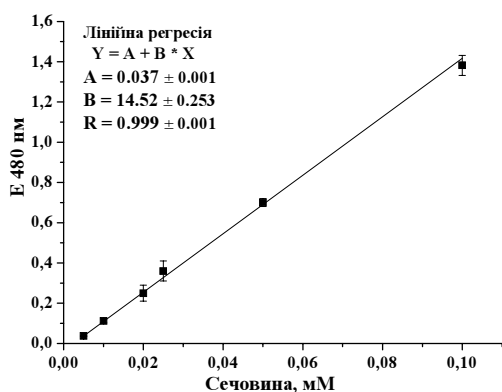


Рис. 3. Калібрувальний графік для колориметричного визначення сечовини. Коефіцієнт B лінії регресії відповідає коефіцієнту мілімолярної екстинкції продукту реакції.

досліджували умови проведення реакції. З метою оптимізації умов першої стадії експериментально визначали склад інкубаційної суміші та час проведення ензиматичної реакції (рис. 2). Для оптимізації хімічної стадії тестували концентрацію ДМО й умови для ефективного утворення кольорового продукту — тривалість кип'ятіння (рис. 3).

На рис. 2 представлено залежність аналітичного сигналу на L-Arg, тобто оптичної густини фотометрованої суміші, від різних умов проведення ензиматичної стадії аналізу. Як видно з рис. 2, аналітичний сигнал пропорційно зростає при збільшенні концентрації L-Arg і залежить від концентрації аргінази I та часу інкубації на першій стадії аналізу. На основі отриманих даних (рис. 2А і 2Б) було ви-

брано оптимальні умови проведення ензиматичної реакції: час інкубації із ферментом — 15 хв; концентрація аргінази I в інкубаційній суміші — 1,5 Од./мл.

На другій стадії реакції (хімічній) здійснювали колориметричне визначення сечовини за відомим методом [42]. Нами встановлено, що аналітичний сигнал на L-Arg залежить від умов проведення хімічної реакції. Збільшення концентрації ДМО від 0,4 до 0,6 % суттєво не впливало на результат, але подовження часу кип'ятіння до 40 хв дало змогу значно збільшити величину аналітичного сигналу.

Таким чином, у результаті проведених досліджень нами запропоновано оптимальний кількісний склад реакційної суміші для визначення L-Arg ензиматичним методом із спектрофотометричною детекцією продукту реакції та умови виконання аналізу.

На рис. 4 представлено результати вивчення залежності оптичної густини реакційної суміші від концентрації L-Arg і встановлення діапазону лінійності для СФ-методу за оптимізованих умов аналізу. Лінійність калібрувальної кривої для аналізу L-Arg зберігається в межах 0,007-0,1 мМ L-Arg у фотометрованій пробі. Порогова чутливість методу — 0,005 мМ. Порівняння мілімолярних коефіцієнтів екстинкції сечовини ($14,52 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$) і L-Arg ($11,58 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$) свідчить про 81%-ну конверсію L-Arg до продукту ензиматичного гідролізу. Отже, за умов надлишку аргінази I можна очікувати 1,5-кратного підвищення чутливості методу.

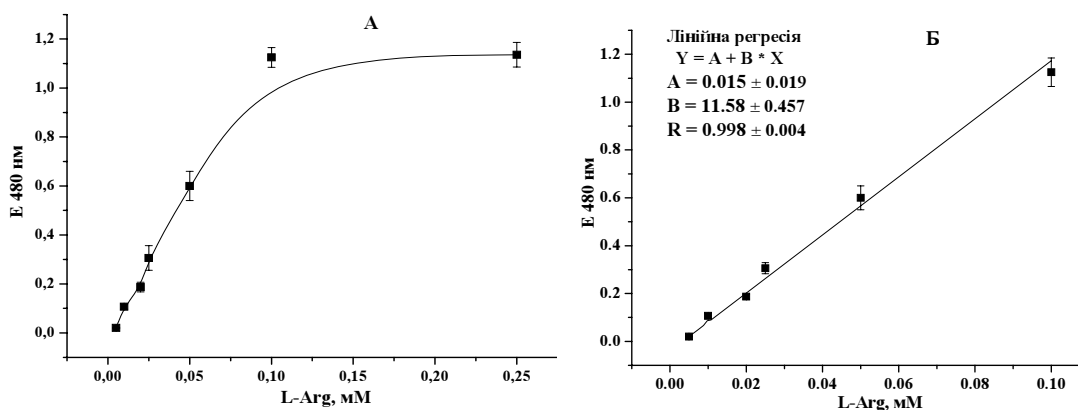


Рис. 4. Залежність аналітичного сигналу від концентрації L-Arg у фотометрованої суміші (А) і діапазон лінійності ензиматично-фотометричного методу (Б). Коефіцієнт B лінії регресії відповідає коефіцієнту мілімолярної екстинкції L-Arg.

Важливою характеристикою методу є селективність до різних амінокислот. Рівень селективності ензиматичного методу оцінювали у відносних одиницях (%) оптичної густини (A) відповідно до величини максимального сигналу, прийнятої за 100 %. Як видно з рис. 5, найвищий сигнал спостерігається для L-Arg, але існує також інтерферуючий вплив канаваніну (15 %) і незначний — цитруліну (1 %). Інші амінокислоти не реєстрували запропонованим СФ-методом, що можна пояснити високою селективністю аргінази I до природного субстрату — L-Arg. Позитивний сигнал на канаванін пов'язаний із здатністю гідролізувати цю амінокислоту з утворенням сечовини. Цей факт не є суттєвим для аналізу реальних зразків, оскільки ця рідкісна амінокислота зустрічається, як правило, тільки в насінні деяких рослин [45].

Можливість практичного використання розробленого методу вивчали на зразках фармацевтичних препаратів, що містять L-Arg.

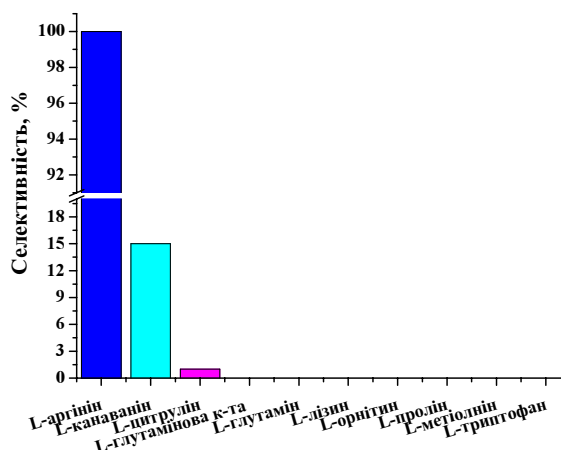


Рис. 5. Тест на селективність ензиматично-спектрофотометричного методу аналізу для зразків 0,04 мМ амінокислот у 30 мМ Трис-НСІ, рН 8,8.

Дослідження проводили методом множинних внесень стандарту в декількох повторах при різних розведеннях зразків (рис. 6).

Результати визначення вмісту L-Arg у зразках фармацевтичних препаратів різними

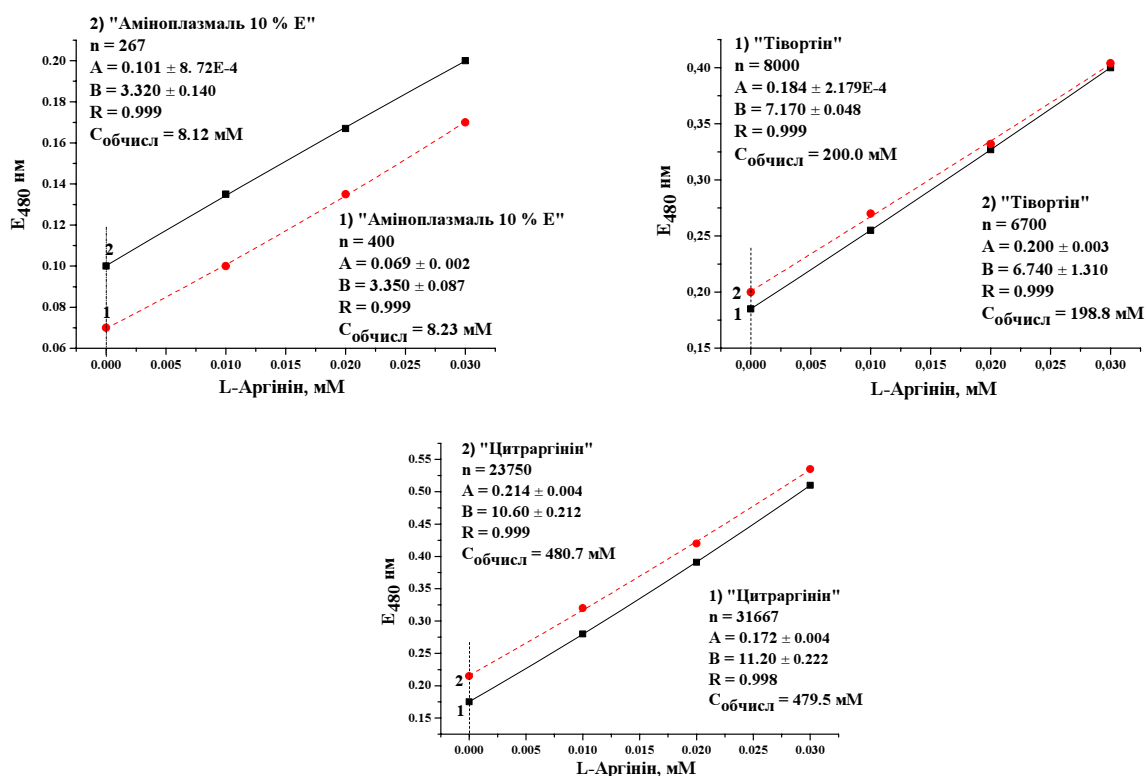


Рис. 6. Визначення вмісту L-Arg у зразках фармацевтичних препаратів запропонованим методом. На графіках представлено статистичні дані: параметри лінійної регресії ($Y=A+B \cdot X$), де Y — оптична густина; X — концентрація L-Arg, мМ; A — оптична густина зразка без додавання екзогенного L-Arg; B — значення нахилу; R — коефіцієнт лінійної регресії; n — розведення досліджуваного зразка.

Порівняння результатів визначення концентрації L-аргініну різними методами

Реальний зразок	Методи								
	Заявлено виробником	Ензиматичний, ця стаття		Референтний, ця стаття		Біосенсорні			
		L-Arg, мМ	L-Arg, мМ	КВ%	L-Arg, мМ	КВ %	L-Arg, мМ	КВ, %	L-Arg, мМ
Тивортін	199,3	199,4±0,9	0,4	198,2±2,1	1,2	200,3±2,5	0,8	200,7±4,5	2,1
Цитрагінін	475,0	480,1±0,9	0,2	482,0±3,9	1,8	479,9±4,7	1,4	447,2±3,3	7,9
Аміноплаз-малъ 10% Е	8,0	8,2±0,1	1,0	7,9±0,3	0,8	7,8±0,3	2,2	8,5±0,3	1,3

Примітка. КВ* — коефіцієнт варіації.

методами представлено в табл. 1. Як видно з таблиці, існує добра кореляція між даними, отриманими різними методами, зокрема новим ензиматично-спектрофотометричним методом, референтним хімічним ($R=0,998$) і показниками виробника.

Висновки. Розроблено чутливий і селективний ензиматичний метод кількісного аналізу L-Arg із спектрофотометричним способом детекції кольорового продукту реакції (сечовини) за допомогою діацетил-(2,3-бутандіон) монооксиму. Запропонований метод базується на використанні високоочищеної аргінази І людини, одержаної нами за власною тех-

нологією із клітин дріжджового рекомбінантного штаму-продуцента. Метод є простим у виконанні, не потребує складної підготовки зразків до аналізу і може використовуватись для кількісного визначення вмісту L-Arg у фармацевтичних препаратах методом множинних додавань стандарту. Новому методу властива висока порогова чутливість визначення L-Arg (0,005 мМ), широкий діапазон лінійності (0,007-0,1 мМ), а також нечутливість до інтерферуючого впливу широкого спектра амінокислот.

Надійшла в редакцію 15.06.2012 р.

Enzymatic method for L-arginine assay based on recombinant human arginase I

N.Ye. Stasyuk^{1,2}, G.Z. Gayda¹, A.V. Gayda¹, M.V. Gonchar¹, Ye.P. Koval'chuk²

¹ Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine
14/16, Drahomanov Str., Lviv, 79005, Ukraine

² Ivan Franko National University of Lviv
6, Kyryla and Mefodia Str., Lviv, 79005, Ukraine

Summary. Enzymatic-spectrophotometric method for L-arginine assay based on human arginase I isolated from the recombinant yeast strain *Hansenula polymorpha* was developed. The new method is selective and rather simple. Linear detection range was estimated to be from 0.007 to 0.1 mM in reaction mixture, and detection limit — 0.005 mM L-arginine. The method was tested on the real samples of L-arginine-containing commercial pharmaceuticals products. It was shown, that the estimated L-arginine contents were in a good correlation with that declared by producers, with results of referent chemical ($R=0.998$) and some other methods.

Keywords: L-arginine, arginase I, enzymatic method, diacetyl-(2,3-butandione) monooxime.

Перелік літератури

1. Guoyao W.U., Morris S.M. // J. Biochem. — 1998. — 366. — P. 1-17.
2. Kepka-Lenhart D., Mistry S.K., Wu G., Morris S.M. Jr. // Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. — 2000. — 279, No. 6 — P. 2237-2242.
3. Morris S.M. Jr., Bhamidipati D., Kepka-Lenhart D. // Gene. — 1997. — 193, No. 2. — P. 157-161.
4. Visek W.J. // Nutr. — 1985. — 116, No. 1. — P. 36-46.
5. Cheng P.N.M., Leung Y.C., Lo W.H., Tsui S.M., Lam K.C. // J. Cancer Letters. — 2005. — 224. — P. 67-80.
6. Glazer E.S., Stone E.M., Zhu C., Massey K.L., Hamir A.N., Curley S.A. // Transl. Onc. — 2011. — 4, No. 3. — P. 138-146.
7. Mauldin J.P., Zeinali I., Kleypas K., Woo J.H., Blackwood R.S., Jo C.H., Stone E.M., Georgiou G., Frankel A.E. // Transl. Onc. — 2012. — 5, No. 1. — P. 26-31.
8. Wheatley D.N., Campbell E., Lai P.B.S., Cheng P.N.M. // Gene Ther. Mol. Biol. — 2005. — 9. — P. 33-40.
9. Uthurry C.A., Suarez Lepe J.A., Lombardero J., Garcia Del Hierro J.R. // J. Food Chem. — 2006. — 94. — P. 262-270.

10. Spayd S.E., Wample R.L., Evans R.G., Stevens R.G., Seymour B.J., Nagel C.W. // *Am. J. Enol. Vitic.* — 1994. — 45. — P. 34-42.
11. Huang Z., Ough C.S. // *Am. J. Enol. Viticult.* — 1989. — 40. — P. 135-139.
12. Hernandez L., Escalona J., Joshi N., Guzman N. // *J. Chromatogr.* — 1991. — 559. — P. 183-196.
13. Li P., Zhang C. // *J. Fenxi Huaxue.* — 1991. — 19. — P. 238-240.
14. Chu K.M., Huang P.W., Pao L.H. // *J. Med. Sci.* — 2003. — 23, No. 4. — P. 201-206.
15. Ivnitskii D.M., Rishpon J. // *Anal. Chim. Acta.* — 1993. — 282. — P. 517-525.
16. Koncki R., Walcerz I., Ruckruh F., Glab S. // *Anal. Chim. Acta.* — 1996. — 333. — P. 215-222.
17. Komaba S., Fujino Y., Matsuda T., Osaka K., Satoh I. // *J. Electrochem. Soc.* — 1999. — 146, No. 2. — P. 615-619.
18. Nikolelis D.P., Hadjiioannou T.P. // *Anal. Chim. Acta.* — 1983. — 147. — P. 33-39.
19. Saiapina O.Y., Dzyadevych S.V., Jaffrezic-Renault N., Soldatkin O.P. // *Talanta.* — 2012. — 92. — P. 58-64.
20. Sastry C.S.P., Tummuru M.K. // *J. Food Chem.* — 1994. — 15. — P. 257-260.
21. Sakaguchi S. // *J. Biochem.* — 1925. — 5. — P. 25-32.
22. Goldschmidt M.C., Lockhart B.M. // *Anal. Chem.* — 1971. — 43. — P. 1475-1479.
23. Casadebains F., Dupri J.P., Mesnard P. // *Ann. Pharm. Fr.* — 1979. — 37. — 7. — P. 313-324.
24. Khranov V.A., Petrova L.M., Binova E. // *Lab. Delo.* — 1980. — 11. — P. 651-653.
25. Micklus M.J., Stein I.M. // *Anal. Biochem.* — 1973. — 54. — P. 545-553.
26. Hua W., Xin-hong L., Rui-xiang Z., Lidan F., Hua L. // *Agric. Sci. China.* — 2008. — 7, No. 10. — P. 1210-1215.
27. Gange M.E., Francis P.S., Costin J.W., Barnett N.W., Lewis S.W. // *J. Sci. Food Agric.* — 2005. — 85. — P. 1217-1221.
28. Lobenhoffer J.M., Krug O., Stefanie M., Bogerh B. // *J. Mass Spectrom.* — 2004. — 39. — P. 1287-1294.
29. Mira de Orduna R. // *J. Agric. Food Chem.* — 2001. — 49, No. 2. — P. 549-552.
30. Gaede G., Grieshaber M. // *Anal. Biochem.* — 1975. — 66, No. 2. — P. 393-399.
31. Нагорний В.О., Фалора Л.Р., Борецький Ю.Р., Стасик О.В., Сибірний А.А. // Зб. наукових праць «Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології» з'їзду Українського товариства генетиків та селекціонерів. — Алушта, 2007. — Т. 1. — С. 366-371.
32. Стасюк Н.Є., Гайда Г.З., Стасик О.В., Ковальчук Є.П., Гончар М.В. // *Укр. біохім. журн.* — 2010. — Т. 82, № 6. — С. 14-21.
33. Стасюк Н.Є., Гайда Г.З., Гайда А.В., Стасик О.В., Карп'як В.В., Ковальчук Є.П., Гончар М.В. // *Праці НТШ. Сер. «Хемія і Біохемія».* — 2011. — Т. 28. — С. 139-149.
34. Zakalskiy A.E., Zakalska O.M., Rzhepetskiy Y.A., Potocka N., Stasyk O.V., Horak D., Gonchar M.V. // *Protein Expression and Purification.* — 2012. — 81. — P. 63-68.
35. Stasyuk N., Serkiz R., Mudry S., Gayda G., Zakalskiy A., Koval'chuk Y., Gonchar M., Nisnevich M. // *Nanotech. Develop.* — 2011. — 1:e3. — P. 11-15.
36. Стасюк Н.Є., Серкіз Р.Я., Гайда Г.З., Ковальчук Є.П., Гончар М.В. // *Вісн. Львів. ун-ту. «Серія Хім.»* — 2011. — Т. 52. — P. 261-267.
37. Пат. u201104302, МПК51 G01N 33/00 (2011.01) / Саяпіна О.Я., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П., Стасюк Н.Є., Гайда Г.З., Гончар М.В. — № 64025; заявл. 08.04.2011; опубл. 25.10.2011; Бюл. № 20.
38. Stasyuk N., Smutok O., Gayda G., Koval'chuk Y., Gonchar M. // *J. Mater. Sci. Eng.* — 2011. — 1. — P. 819-827.
39. Stasyuk N., Smutok O., Gayda G., Vus B., Gonchar M., Koval'chuk Ye. // *Biosens. Bioelectron.* — 2012. — 37, No. 1. — P. 46-52.
40. Меньшиков В.В. *Лабораторные методы исследования в клинике.* — М.: Медицина, 1987. — 368 с.
41. Золотов Ю.А. *Основы аналитической химии.* — М.: Академия, 2010. — 416 с.
42. Rho J.H. // *Clin. Chem.* — 1972. — 18, No. 5. — P. 476-478.
43. Lugosi R., Thibert R.J., Holland W.J., Lam L.K. // *Clin. Biochem.* — 1972. — 5. — P. 171-181.
44. Butler A.R., Hussain I., Leitch E. // *Clin. Chim. Acta* — 1981. — 112. — P. 357-360.
45. Rosenthal G.A., Dahlman D.L. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 83, No. 1. — P. 14-18.