

УДК 612.354: 576.53

¹Б.А. Умбаев*, ¹Ш.Н. Аскарлова, ²Т.М. Шалахметова, ¹А.К. Цой, ¹Д.С. Буланин¹Центр наук о жизни, Назарбаев Университет, Казахстан, г. Астана²Казахский Национальный Университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

*e-mail: bauyrzhan.umbayev@nu.edu.kz

Внутрибрюшинная трансплантация аллогенных гепатоцитов крысам с индуцированным токсическим циррозом печени

В результате проведенных исследований было установлено, что интраперитонеальная трансплантация аллогенных гепатоцитов крысам с индуцированным токсическим циррозом печени приводит к заселению лимфоидных фолликулов кишечника клетками, позитивно окрашенными на маркер гепатоцитов Hep Par 1. При этом наблюдалось снижение смертности животных и нормализация биохимических показателей функции печени.

Ключевые слова: печень, цирроз, гепатоцит, клеточная терапия, трансплантация

Б.А. Умбаев, Ш.Н. Аскарлова, Т.М. Шалахметова, А.К. Цой, Д.С. Буланин
Токсикалық циррозды егеуқұйрықтарға интраперитонеальды әдісімен аллогендық гепатоциттерді трансплантациялау

Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде интраперитонеальды әдісімен жекелеген гепатоциттерді еңгізу, токсикалық циррозды егеуқұйрықтар ішегін лимфоидты фолликулдарында, гепатоциттердің маркері Hep Par 1 бойынша позитивті, клеткалардың таралуына себеп болғаны және сонымен бірге жануарлардың өлімін төмендеткені және бауырдың биохимиялық көрсеткіштерін қалыпты жағдайға келтіргені анықталды.

Түйін сөздер: бауыр, цирроз, гепатоцит, жасушалық терапия, трансплантация

B.A. Umbayev, Sh.N. Askarov, T.M. Shalahmetov, A.K. Tsoi, D.S. Bulanin
Intraperitoneal allogeneic hepatocyte transplantation in rats with induced toxic liver cirrhosis

Allogeneic hepatocytes were transplanted into peritoneal cavity in rats with induced toxic liver cirrhosis. Hepatocytes were found to accumulate in intestinal lymph nodes and were positively stained for Hep Par 1 marker. The whole approach improved the liver function and reduced mortality in rats with toxic liver cirrhosis.

Key words: liver, cirrhosis, hepatocyte, cell therapy, transplantation

В Казахстане, как и в других странах мира, болезни печени относятся к категории часто встречающихся патологий, которые могут приводить к смертельному исходу [1]. Эффективным способом лечения острой и хронической печеночной недостаточности, цирроза печени, некоторых видов рака и метаболических аномалий является трансплантация печени. В настоящее время проводится большое число операций по пересадке печени, и печень является вторым, наиболее часто пересаживаемым органом [2]. Однако, хроническая нехватка доноров является одним из главных препятствий для широкого применения трансплантации этого органа [3]. Поэтому поиск альтернативных подходов, ко-

торые позволяли бы пациентам дожидаться своей очереди трансплантации, является актуальной задачей современной трансплантологии. Возможной альтернативой трансплантации целого органа является клеточная терапия [4,5]. Существуют определенные преимущества трансплантации клеток по сравнению с трансплантацией целого органа: 1) клеточная терапия является менее инвазивной и может быть относительно легко повторена; 2) возможность терапии большого количества пациентов клетками от одного донора; 3) клетки можно долго сохранять путем криоконсервации; 4) выделенные из органа донора клетки, могут быть генетически модифицированы в условиях *in vitro*, если это необходимо. В

настоящее время метод клеточной терапии, основанный на трансплантации гепатоцитов (ТГ), проходит клинические испытания на пациентах с различными заболеваниями печени, такими как врожденные нарушения обмена веществ печени, острая и хроническая печеночная недостаточность [4,5]. Несмотря на большой прогресс в трансплантации гепатоцитов, по-прежнему существует ряд нерешенных методологических трудностей клеточной терапии болезней печени, среди которых весьма важными являются качество и количество донорского материала и способы введения клеток. Так, например, наиболее часто используемый метод инъекции гепатоцитов в печень через воротную вену, имеет ряд недостатков. Как известно, он применим только при нормальной архитектонике печени, тогда как при нарушениях структуры органа, особенно при циррозе, он может привести к длительной портальной гипертензии и эмболизации трансплантированными клетками сосудов в легких или других органах [6,7]. Прямая трансплантация гепатоцитов в печень таким пациентам может иметь негативные последствия. В связи с этим необходим поиск альтернативных способов введения трансплантируемых клеток в организм. Одним из таких методов является введение клеток во внепеченочные структуры, где пересаженные клетки должны образовывать эктопическую ткань, которая позволит компенсировать функцию поврежденного органа. В ряде исследований было показано, что трансплантированные во внепеченочные органы (селезенка, брюшина, легкое, почка) гепатоциты способны выживать и даже размножаться [8-13].

Эктопическая трансплантация гепатоцитов имеет определенные преимущества по сравнению с интрапортальной: эктопические сайты могут потенциально предоставить больше пространства для пересадки и, значит, обеспечить возможность трансплантации минимально инвазивным способом большого количества гепатоцитов. Этот метод трансплантации дает меньше осложнений, чем интрапортальная трансплантация. Еще одно важное преимущество заключается в том, что донорские клетки можно легко отличить от клеток реципиента, что облегчает оценку состояния клеток в биопсийных образцах [14].

В 2011 году Норро и соавторы продемонстрировали способность гепатоцитов выживать

и пролиферировать в лимфатических узлах мышцей и снижать смертность, вызванную острой печеночной недостаточностью [15]. Авторы предложили новую парадигму, в которой они предлагают рассматривать лимфатические узлы как *in vivo* биореакторы для эктопических тканей. Данный подход может серьезным образом повлиять на развитие клеточной терапии поврежденных органов, так как его практическое применение позволит усилить эффективность применения трансплантации клеток. В связи с этим, исследование потенциала лимфатических узлов как *in vivo* биореакторов для эктопических тканей является весьма перспективным направлением исследований. Данная концепция требует проведения дополнительных исследований оценки потенциала лимфатических узлов как *in vivo* биореакторов с применением различных моделей поражения органов.

В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования явилось изучение возможности образования эктопической ткани при внутрибрюшинной трансплантации гепатоцитов крысам с индуцированным токсическим фиброзом печени.

Материалы и методы исследований

В эксперименте использовали 72 половозрелых белых беспородных крыс-самцов с массой тела 200-230 г. Животные были разбиты на 12 групп по 6 в каждой: I-III группы – животные, которым внутрибрюшинно вводили только HBSS буфер однократно (контроль) с последующим забоем животных через 1 неделю, 1 месяц и 2 месяца, IV-VI группы – животные, которые получали иммуносупрессор циклоспорин-А (Novartis, Sandimun neoral) в дозировке 25 мг/кг перорально в течение 1 недели, 1 месяца и 2 месяцев соответственно; VII-IX животные получали нитрозодиметиламин (НДМА) в дозировке 10 мг/кг внутрибрюшинно по три дня в неделю в течение 4-х недель с последующим забоем животных через 1 неделю, 1 месяц и 2 месяца, соответственно; X-XII – животные получали НДМА, в такой же дозировке и такое же время как и в предыдущей группе, с дальнейшей трансплантацией гепатоцитов, кроме того они ежедневно получали циклоспорин-А в дозировке 25 мг/кг перорально в течение 1 недели, 1 месяца и 2 месяцев, соответственно.

Донорские изолированные гепатоциты получали с помощью способа Сеглена [16]. Суспен-

зию полученных гепатоцитов разводили HBSS буфером, а затем вводили экспериментальным животным внутривенно, из расчета $3-5 \cdot 10^6$ клеток на крысу, в течение 15 минут после выделения.

Подопытных животных умерщвляли под эфирным наркозом. Для исследования биохимических показателей забирали образцы цельной крови, а для проведения гистологического и иммуногистохимического исследования – кусочки висцеральных органов (печень, кишечник).

Оценка состояния функций печени производилась с помощью анализа биохимических показателей, таких как активность аминотрансфераз и гаммаглутамилтрансферазы, содержание общего белка, билирубина и альбумина в сыворотке крови. Активность аминотрансфераз определяли с помощью динитрофенилгидразинового метода [17], а активность гаммаглутамилтрансферазы с помощью метода, основанного на реакции переноса глутаминовой кислоты на акцептор – глицил-глицин, с образованием 5-амино-2-нитробензоата, которую катализирует гамма-глутамилтрансфераза [18]. **Общий белок** в сыворотке определяли с помощью унифицированного метода по биуретовой реакции [19]. Содержание альбумина оценивалось с помощью метода, основанного на способности альбумина образовывать в кислой среде комплекс с бромкрезоловым зеленым [19]. **Концентрацию общего билирубина** определяли с помощью реакции азосочетания [20].

Из зафиксированных в 10% нейтральном формалине образцов тканей по общепринятой методике изготавливали гистологические срезы, которые окрашивали гематоксилин-эозином и по Массону. Иммуногистохимическое окрашивание срезов было проведено с использованием стрептавидин-биотинового метода согласно инструкции фирмы-производителя Dako.

В работе были использованы первичные моноклональные антитела к маркеру гепатоцитов (Hepatocyte marker (Hep Par 1), Клон: OCH1E5. Изотип: IgG1k, Ready-to-use, Dako. В качестве вторичных антител были использован комплекс содержащий декстран с молекулой пероксидазы и вторичным антителом EnVision™ FLEX/HRP. Активность пероксидазы выявляли с помощью хромогена 3'3'-диаминобензидина (Dako). После иммуногистохимических реак-

ций срезы дополнительно окрашивали гематоксилином Майера.

Срезы изучали и фотографировали при помощи микроскопа Leica DM LB2, оснащенного камерой Leica DFC 320 Camera.

Результаты количественных исследований подвергались статистической обработке. Во всех случаях определяли средние значения и ошибку средней величины. Достоверность различий средних величин оценивали, используя t-критерий Стьюдента. Различия считались достоверными при доверительной вероятности, равной 0,95.

Результаты исследований и обсуждение

Микроморфологический анализ показал, что в печени опытных животных, которым для создания печеночной недостаточности вводили НДМА в дозировке 10 мг/кг внутривенно, наблюдалась деструкция паренхимы и стромы, выраженная фиброзом, узелковой регенераторной гиперплазией гепатоцитов с ложными дольками и шунтами между портальной системой и системой печеночных вен. Все это сопровождалось нарушением архитектоники печени. Наряду с фиброзом обнаруживались некрозы печеночных клеток (рисунок 1)

В печени опытных животных отмечалось микроузловое поражение, так как рубцовые изменения захватывали всю печень относительно равномерно, а печеночные долики подразделялись на более мелкие части.

Данные результаты свидетельствуют о том, что выбранная модель токсического поражения печени приводит к фиброзированию, некрозу гепатоцитов, нарушению архитектоники печени.

Для оценки изменений, происходящих в организме животных с поражением печени, и также для определения эффективности клеточной трансплантации необходимо было провести анализ биохимических показателей крови. Как известно, для оценки тяжести паренхиматозных заболеваний печени определяют активность различных сывороточных ферментов, важнейшие из которых – аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспаратаминотрансфераза (АСТ) и гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ). Кроме того, важным показателем поражения печени является подъем уровня содержания билирубина в крови. Так, например, при паренхиматозной желтухе при деструкции гепатоцитов нарушается выведение прямого билирубина в желчные капилляры, и,

таким образом, он попадает непосредственно в кровь.

Как известно печень играет ключевую роль в обмене белков и все альбумины плазмы: 75-90% α -глобулинов и 50% β -глобулинов синтезируются гепатоцитами. Поэтому при поражении печени может нарушиться синтез специфических белков плазмы. Содержание в крови этих белков позволяет оценить синтетические функции печени, а не только степень повреждения гепатоцитов [21].

Результаты биохимического анализа активности АЛТ и АСТ представлены на рисунке 2.

Из приведенных данных видно, что иммуносупрессор циклоспорин А не приводит к достоверному изменению активности АЛТ и АСТ в сыворотке крови по сравнению с контролем. Интоксикация НДМА приводила к достоверному увеличению активности АЛТ в 2,7 и АСТ в 2,2 раза через неделю после введения препарата. Через месяц и два месяца после интоксикации, активность АЛТ и АСТ снижалась в 1,1 и 1,2 раза. У животных, которым были трансплантированы гепатоциты, данные показатели также были выше, чем у контрольных животных, но ниже, чем у животных, получавших только НДМА. Активность ферментов снижалась у животных с увеличением времени и была наименьшей через два месяца после трансплантации.

Результаты биохимического анализа активности гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ) приведены на рисунке 3.

Из представленных на рисунке данных можно видеть, что воздействие иммуносупрессора циклоспорина А не приводила к достоверному увеличению активности ГГТ. Самое значительное повышение активности ГГТ (в 1,8 раза по сравнению с контролем) у животных VII-IX групп наблюдалось через неделю после прекращения воздействию НДМА и постепенно снижалось через 1-2 месяца. В то же самое время, в плазме крови крыс, которым трансплантировали клетки, активность ГГТ по сравнению с контролем была повышена незначительно.

Результаты определения содержания общего билирубина приведены на рисунке 4.

Видно, что содержание билирубина у интактных животных и животных, получавших иммуносупрессор, было практически на одном уровне на всех сроках исследования. Вместе с тем, после интоксикации крыс НДМА уровень

билирубина значительно повышался через неделю воздействия (в 2,73 раза по сравнению с контролем) и постепенно снижался через один и два месяца, но достигал контрольного уровня. Однако в сыворотке животных, которым была проведена трансплантация клеток, уровень билирубина был повышен в 1,6 раза через неделю после трансплантации клеток, а через месяц уже наблюдалось полное восстановление функции до нормы.

Результаты биохимического анализа содержания общего белка приведены на рисунке 5.

На всех сроках исследования содержание общего белка сыворотке крови у интактных животных и животных, получавших иммуносупрессор, практически не различалось. У животных, получавших НДМА, наблюдалось снижение содержания общего белка в 1,6 раза по сравнению с контролем через неделю воздействия, а через месяц воздействия, наоборот, его повышение. Однако, даже через два месяца после воздействия НДМА содержание общего белка в сыворотке крови у интоксигированных животных не достигало контрольного уровня. У интоксигированных животных, которым внутрибрюшинно вводили суспензию аллогенных гепатоцитов, содержание общего белка также снижалось как и у крыс, получавших только НДМА, однако через месяц после трансплантации содержание общего белка в сыворотке крови достигало контрольного уровня, то есть данный показатель нормализовался.

Результаты исследования содержания альбумина в сыворотке крови подопытных животных приведены на рисунке 6. Известно, что при остром или легком поражении печени концентрация альбумина практически не изменяется. Его синтез нарушается лишь при обширном повреждении гепатоцитов. Поэтому снижение концентрации альбумина в крови при хронических заболеваниях печени служит надежным показателем тяжести поражения [21]. Из рисунка 6 видно, что интоксикация крыс НДМА приводит к значительному снижению альбумина (в 1,7 раза по сравнению с контролем) через неделю после прекращения интоксикации. Через 1 месяц и 2 месяца его концентрация повышалась, но не достигала контрольного уровня. У животных с трансплантированными гепатоцитами содержание альбумина в сыворотке крови было достоверно сниженным только через неделю

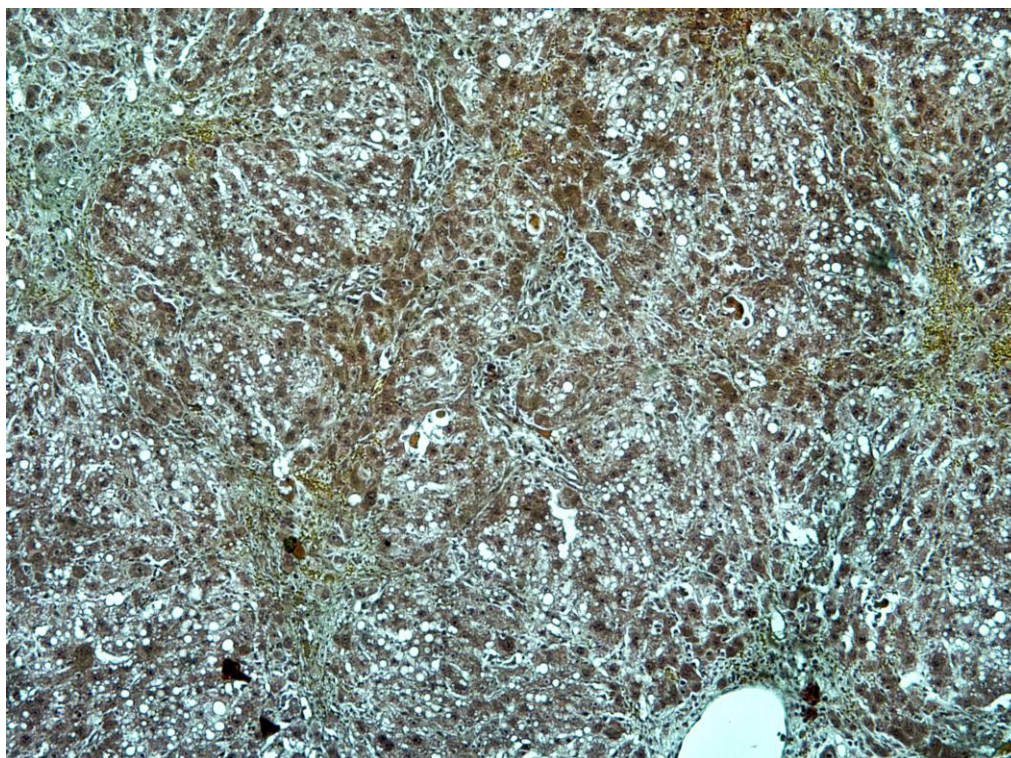


Рисунок 1 – Гистоструктура печени крыс, получавших НДМА. Ложные дольки, шунты между портальной системой и системой печеночных вен, жировая дистрофия и некроз гепатоцитов. Окраска по Массону. Увеличение x 200.

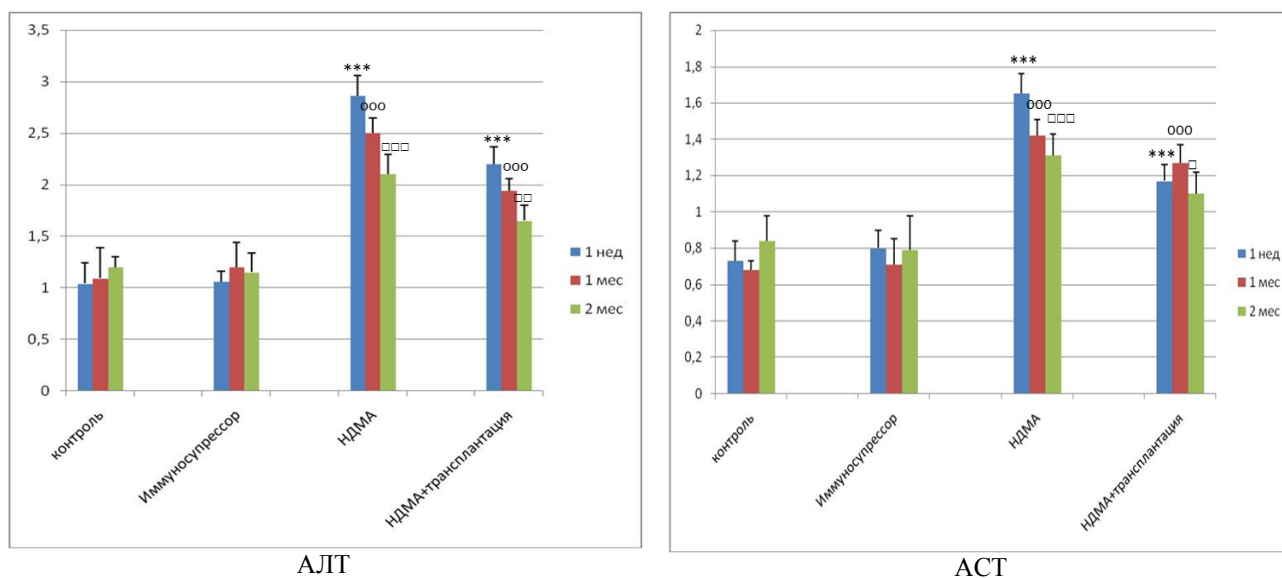


Рисунок 2 – Активность АЛТ и АСТ в сыворотке крови опытных животных (ммоль/ч*л),
 *** - $p \leq 0.001$ по сравнению с контролем, 1 неделя посттрансплантационного периода,
 *** - $p \leq 0.001$ по сравнению с контролем, 1 месяц посттрансплантационного периода,
 *** - $p \leq 0.001$ по сравнению с контролем, 2 месяца посттрансплантационного периода,
 * - $p \leq 0.01$ по сравнению с контролем, 1 неделя посттрансплантационного периода,
 * - $p \leq 0.05$ по сравнению с контролем, 1 неделя посттрансплантационного периода.

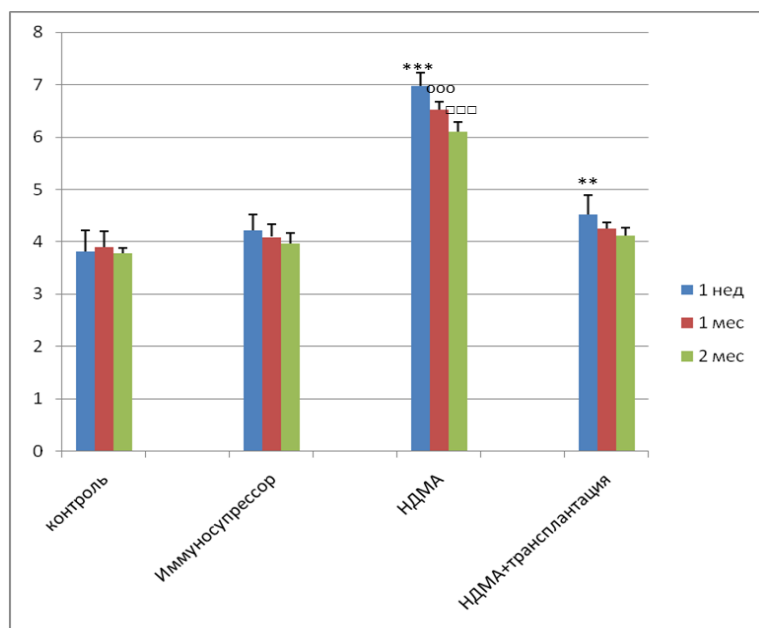


Рисунок 3 – Активность гамма-глутамилтрансферазы в сыворотке крови опытных животных (Е/л),

*** - $p \leq 0.001$ по сравнению с контролем, 1 неделя пострасптантационного периода,

** - $p \leq 0.01$ по сравнению с контролем, 1 неделя пострасптантационного периода,

⁰⁰ - $p \leq 0.001$ по сравнению с контролем, 1 месяц пострасптантационного периода,

01 ^{□□□} - $p \leq 0.001$ по сравнению с контролем, 2 месяца пострасптантационного периода

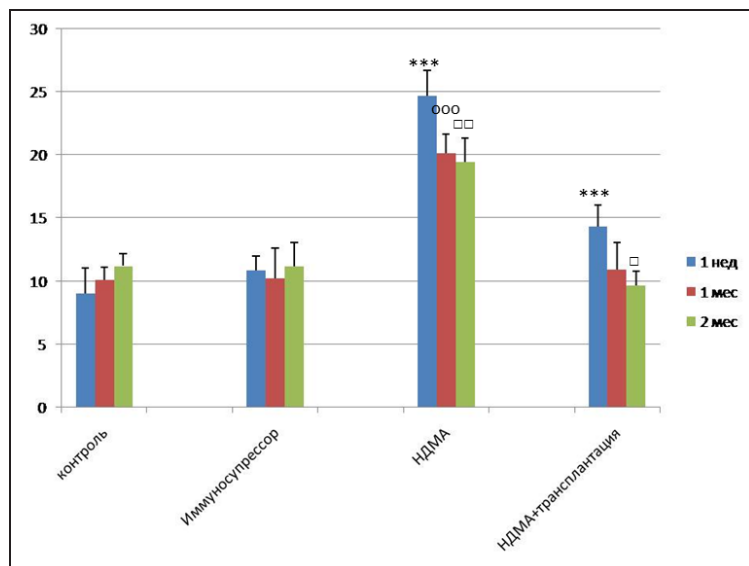


Рисунок 4 – Содержание общего билирубина в сыворотке крови опытных животных мкмоль/л,

*** - $p \leq 0.001$ по сравнению с контролем, 1 неделя пострасптантационного периода,

⁰⁰⁰ - $p \leq 0.001$ по сравнению с контролем, 1 месяц пострасптантационного периода,

^{□□} - $p \leq 0.01$ по сравнению с контролем, 2 месяца пострасптантационного периода,

[□] - $p \leq 0.05$ по сравнению с контролем, 2 месяца пострасптантационного периода.

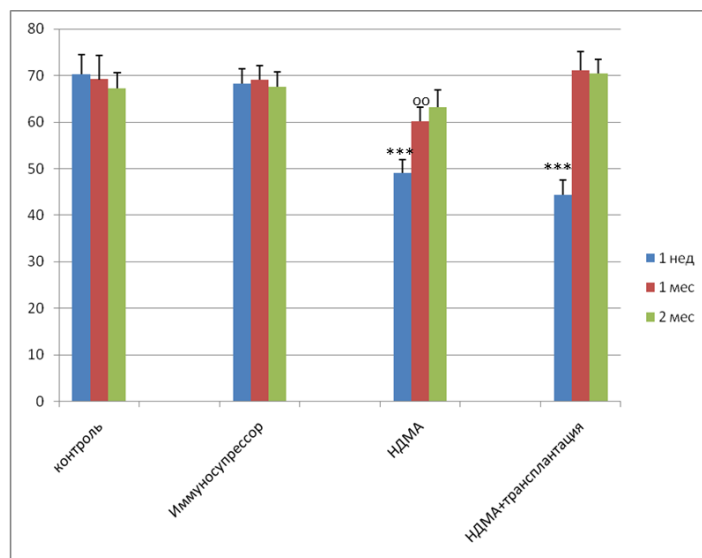


Рисунок 5 – Содержание общего белка в сыворотке крови опытных животных г/л,
⁰⁰ - $p \leq 0.01$ по сравнению с контролем, 1 месяц посттрансплантационного периода,
 *** - $p \leq 0.001$ по сравнению с контролем, 1 неделя посттрансплантационного периода

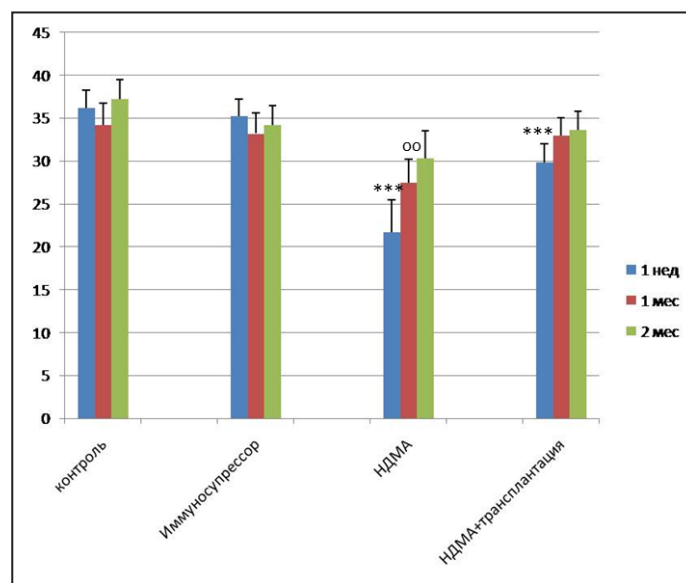


Рисунок 6 – Содержание альбумина в сыворотке крови опытных животных г/л,
⁰⁰ - $p \leq 0.01$ по сравнению с контролем, 1 месяц посттрансплантационного периода,
 *** - $p \leq 0.001$ по сравнению с контролем, 1 неделя посттрансплантационного периода

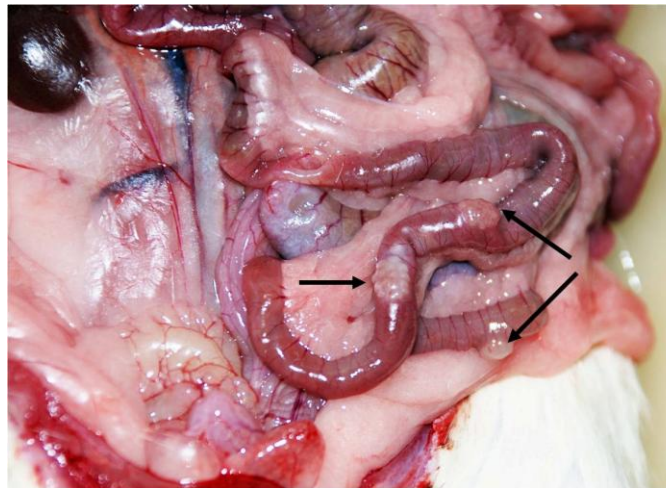


Рисунок 7 – Увеличенные кишечные лимфатические узлы (показаны стрелками) крысы, которой проводилась трансплантация гепатоцитов.

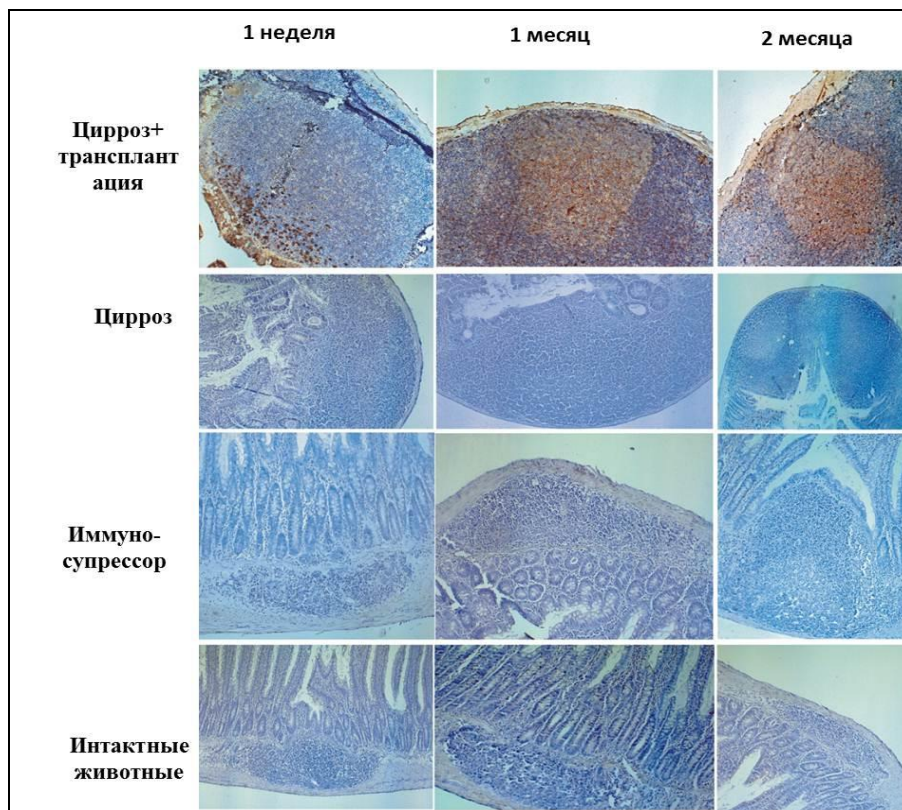


Рисунок 8 – Иммуногистохимическое окрашивание клеток на Her Par 1 в лимфоидных фолликулах кишечника крыс, которым проводилась трансплантация гепатоцитов. Увеличение x100

после воздействия, а через 1 и 2 месяца воздействия этот показатель постепенно повышался.

Следует отметить, что в ходе эксперимента в тех группах, где животные получали только НДМА, отмечалась 30% смертность, причем гибель крыс наблюдалась в первые две недели после окончания интоксикации, а все животные, которым были трансплантированы клетки, выживали.

При макроскопическом наблюдении у животных, получавших НДМА, с дальнейшей трансплантацией гепатоцитов, уже на 1-й неделе отмечалось значительное увеличение лимфоидных фолликулов кишечника (рисунок 7), которые оставались увеличенными и после 1 месяца и 2 месяцев посттрансплантационного периода, а иммуногистохимический анализ срезов на маркер гепатоцитов Her Par 1 показал, что в паренхиме лимфоидных фолликулов кишечника отмечалось скопление Her Par 1 позитивно окрашенных клеток (рисунок 8).

Данные клетки морфологически отличались от собственных клеток лимфоидного фолликула. Her Par 1 – позитивные клетки имели цитоплазматическую окраску и их ядра были больше по размеру, чем ядра клеток лимфоузла. При

этом через неделю после трансплантации отмечалось краевое расположение Her Par 1 позитивно окрашенных клеток, тогда как после 1 и 2 месяцев данные клетки были сконцентрированы уже в центре лимфоидного фолликула, и их количество значительно увеличивалось по сравнению с животными после 1 недели трансплантации. В других опытных группах животных такая картина не наблюдалась.

Таким образом, результаты проведенного биохимического, гистологического и иммуногистохимического исследования свидетельствуют о том, что аллогенная интраперитонеальная трансплантация донорских гепатоцитов улучшает функциональные показатели печени у животных, подвергавшихся токсическому воздействию гепатотоксина НДМА, вызвавшему развитие токсического гепатита и цирроза печени. Показано, что заселение трансплантированных гепатоцитов происходит в лимфоидные фолликулы кишечника крыс, число которых увеличивается со временем. Выживаемость животных с трансплантированными донорскими гепатоцитами возрастает по сравнению с НДМА интоксигированными животными.

Литература

- 1 Mehrabi A., Fonouni H., Muller S.A., Schmidt J. Current concepts in transplant surgery: liver transplantation today // *Langenbecks Arch Surg.* -2008. -Vol. 393, № 3. – P. 245-60.
- 2 Linden P.K. History of solid organ transplantation and organ donation // *Crit Care Clin.* -2009. -Vol. 25, № 1. – P. 165-84, ix.
- 3 Nussler A., Konig S., Ott M., Sokal E., Christ B., Thasler W., Brulport M., Gabelein G., Schormann W., Schulze M., Ellis E., Kraemer M., Nocken F., Fleig W., Manns M., Strom S.C., Hengstler J.G. Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases // *J Hepatol.* -2006. -Vol. 45, № 1. – P. 144-59.
- 4 Hughes R.D., Mitry R.R., Dhawan A. Current status of hepatocyte transplantation // *Transplantation.* -2012. -Vol. 93, № 4. – P. 342-7.
- 5 Dhawan A., Puppi J., Hughes R.D., Mitry R.R. Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* -2010. -Vol. 7, № 5. – P. 288-98.
- 6 Gupta S., Lee C.D., Vemuru R.P., Bhargava K.K. 111Indium labeling of hepatocytes for analysis of short-term biodistribution of transplanted cells // *Hepatology.* -1994. -Vol. 19, № 3. – P. 750-7.
- 7 Bohnen N.I., Charron M., Reyes J., Rubinstein W., Strom S.C., Swanson D., Towbin R. Use of indium-111-labeled hepatocytes to determine the biodistribution of transplanted hepatocytes through portal vein infusion // *Clin Nucl Med.* -2000. -Vol. 25, № 6. – P. 447-50.
- 8 Benedetti E., Kirby J.P., Asolati M., Blanchard J., Ward M.G., Williams R., Hewett T.A., Fontaine M., Pollak R. Intrasplenic hepatocyte allotransplantation in dalmation dogs with and without cyclosporine immunosuppression // *Transplantation.* -1997. -Vol. 63, № 9. – P. 1206-9.
- 9 Jaffe V., Darby H., Selden C., Hodgson H.J. The growth of transplanted liver cells within the pancreas // *Transplantation.* -1988. -Vol. 45, № 2. – P. 497-8.
- 10 Ohashi K., Koyama F., Tatsumi K., Shima M., Park F., Nakajima Y., Okano T. Functional life-long maintenance of engineered liver tissue in mice following transplantation under the kidney capsule // *J Tissue Eng Regen Med.* -2010. -Vol. 4, № 2. – P. 141-8.
- 11 Ohashi K., Marion P.L., Nakai H., Meuse L., Cullen J.M., Bordier B.B., Schwall R., Greenberg H.B., Glenn J.S., Kay M.A. Sustained survival of human hepatocytes in mice: A model for in vivo infection with human hepatitis B and hepatitis delta viruses // *Nat Med.* -2000. -Vol. 6, № 3. – P. 327-31.
- 12 Sano K., Cusick R.A., Lee H., Pollok J.M., Kaufmann P.M., Uyama S., Mooney D., Langer R., Vacanti J.P. Regenerative signals for heterotopic hepatocyte transplantation // *Transplant Proc.* -1996. -Vol. 28, № 3. – P. 1857-8.

- 13 Selden C., Gupta S., Johnstone R., Hodgson H.J. The pulmonary vascular bed as a site for implantation of isolated liver cells in inbred rats // *Transplantation*. -1984. -Vol. 38, № 1. – P. 81-3.
- 14 Harris C.C. Human tissues and cells in carcinogenesis research // *Cancer Res*. -1987. -Vol. 47, № 1. – P. 1-10.
- 15 Hoppe T., Komori J., Manohar R., Stolz D.B., Lagasse E. Rescue of lethal hepatic failure by hepatized lymph nodes in mice // *Gastroenterology*. -2011. -Vol. 140, № 2. – P. 656-666 e2.
- 16 Seglen P.O. Preparation of isolated rat liver cells // *Methods Cell Biol*. -1976. -Vol. 13. – P. 29-83.
- 17 Burns K.A., Kurian S., Burke C.C. Evaluating patients with mildly elevated transaminase levels // *Clin J Oncol Nurs*. -2007. -Vol. 11, № 4. – P. 499-502.
- 18 Persijn J.P., van der Slik W. A new method for the determination of gamma-glutamyltransferase in serum // *J Clin Chem Clin Biochem*. -1976. -Vol. 14, № 9. – P. 421-7.
- 19 B.T. D. Determination of total protein and albumin in serum // *Clin. Chem. Acta*. -1971. -Vol. 31. – P. 87-96.
- 20 Doumas B.T., Perry B.W., Sasse E.A., Straumfjord J.V., Jr. Standardization in bilirubin assays: evaluation of selected methods and stability of bilirubin solutions // *Clin Chem*. -1973. -Vol. 19, № 9. – P. 984-93.
- 21 Шерлок Ш. Д.Д. Заболевания печени и желчных путей. — Москва : Гэтар-МЕД 2002. — 860.