

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 577.151.35:577.152.311

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ЦЕТИЛТРИМЕТИЛАММОНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ХОЛИНЭСТЕРАЗ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Л. П. КУЗНЕЦОВА, В. А. САМОКИШ, Е. Е. СОЧИЛИНА

Учреждение Российской академии наук Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия;
e-mail: esoch@iephb.ru

Исследовано влияние катионного детергента цетилтриметиламмония на каталитическую активность холинэстераз крови человека (ацетилхолинэстеразы эритроцитов крови и бутирилхолинэстеразы плазмы крови) в реакциях гидролиза α -тионафтилацетата и ацетилтиохолина. Показано, что цетилтриметиламмоний является обратимым эффектором для обеих холинэстераз. Это соединение конкурентно ингибирует энзиматический гидролиз субстрата ацетилтиохолина обеими холинэстеразами, а в реакциях энзиматического гидролиза субстрата α -тионафтилацетата проявляет себя как синергический активатор – в опытах с бутирилхолинэстеразой, и как конкурентный обратимый ингибитор – в опытах с ацетилхолинэстеразой. Константы ингибирования цетилтриметиламмонием энзиматической активности ацетилхолинэстеразы, определенные с помощью разных субстратов – ацетилтиохолина и α -тионафтилацетата – близки между собой и составляют $(2,5 \pm 0,3) \times 10^{-5}$ и $(2,8 \pm 0,3) \times 10^{-5}$ М соответственно. Бутирилхолинэстераза более чувствительна к воздействию цетилтриметиламмония, чем ацетилхолинэстераза. Кинетические константы, определенные для этого энзима по эффекту ингибирования гидролиза ацетилтиохолина и активации гидролиза α -тионафтилацетата, также близки между собой и составляют $(3,9 \pm 0,4) \times 10^{-6}$ и $(4,4 \pm 0,4) \times 10^{-6}$ М соответственно.

Ключевые слова: α -тионафтилацетат, ацетилтиохоллин, цетилтриметиламмоний, активация, ингибирование, ацетилхолинэстераза эритроцитов человека, бутирилхолинэстераза плазмы крови человека.

Первые сведения о холинэстеразах, как об энзимах, гидролизующих холиновые эфиры карбоновых кислот, появились более века назад. Однако, достоверно установленной можно считать только биологическую роль синаптической ацетилхолинэстеразы (АХЭ), участвующей в передаче нервного импульса [1]. Функциональное значение холинэстераз, локализованных в других тканях и, особенно, в крови, до настоящего времени окончательно не выяснено. Полагают, что у млекопитающих ген, отвечающий за синтез АХЭ, продуцирует три типа энзимов, содержащих одинаковый каталитический домен, но отличающихся терминальными пептидами [2]. АХЭ эритроцитов крови отводят первостепенную роль при возникновении стрессовых состояний. Бутирилхолинэстеразу (БуХЭ) плазмы крови в последние годы чаще всего рассматривают как защитный агент, вступаю-

щий в действие при попадании в кровяное русло некоторых нежелательных веществ, прежде всего ингибиторов холинэстераз [3]. Данные рентгеноструктурного анализа показывают, что активные центры АХЭ и БуХЭ близки по своему строению [1], однако, кинетика взаимодействия этих двух энзимов с субстратами и ингибиторами имеет индивидуальные особенности.

Многочисленные соединения, содержащие в своей структуре заряженный атом азота, занимают особое место в изучении механизма реакций, катализируемых холинэстеразами. Особенно хорошо исследованы тетраалкиламмонийные соли, являющиеся специфическими обратимыми ингибиторами этих энзимов [1]. Однако в ряде случаев в присутствии тетраалкиламмонийных ионов наблюдается активация холинэстеразного гидролиза субстратов [4, 5].

Ранее нами было показано, что присутствие в реакционной среде катионных детергентов цетилтриметиламмония (ЦТА) и цетилпиридиния, содержащих положительно заряженный атом азота, существенно ускоряет гидролиз флуорогенного субстрата α -нафтилацетата (НА) БУХЭ сыворотки крови лошади, тогда как гидролиз специфического субстрата ацетилхолина в их присутствии замедляется. Константы связывания, определенные по эффекту активации гидролиза α -нафтилацетата и по эффекту ингибирования гидролиза ацетилхолина, были практически одинаковыми, что давало основание предполагать, что молекула детергента в обоих случаях взаимодействует с активным центром энзима с образованием одного и того же комплекса энзим-эффектор [6]. Дальнейшие исследования показали, что гидролиз α -тионафтилацетата (ТНА, тиоаналога НА), катализируемый БУХЭ плазмы крови (человека, лошади, рыбы синца), ускоряется под действием катионного детергента цетилпиридиния, но существенно замедляется, если энзимом является эритроцитарная АХЭ (человека или быка) [7].

В настоящей статье представлены сравнительные исследования влияния катионного детергента цетилтриметиламмония (ЦТА) на ацетилхолинэстеразу эритроцитов и БУХЭ плазмы крови человека в реакциях гидролиза ТНА и ацетилтиохолина (АТХ), а также определены типы взаимодействия и кинетические параметры этих реакций.

Материалы и методы

В работе использовали АХЭ из эритроцитов крови человека (ацетилхолин-ацетилгидролаза, 3.1.1.7), с удельной активностью 5,2 Е на 1 мг протеина и БУХЭ из плазмы крови человека (ацетилхолин-ацетилгидролаза, 3.1.1.8), с удельной активностью 7,4 Е на 1 мг протеина [8].

Субстратами холинэстераз служили АТХ-йодид (SIGMA-ALDRICH) и ТНА, синтезированный известным способом [7]. Исходный раствор ТНА готовили в этиловом спирте с таким расчетом, чтобы концентрация растворителя в реакционной смеси не превышала 1% по объему. Такая концентрация этилового спирта не оказывает влияния на определяемую скорость энзиматического гидролиза. В качестве эффектора использовали ЦТА-бромид ($C_{16}H_{33}(CH_3)_3N^+ \cdot Br^-$, Serva, Германия).

Для проверки индивидуальности использованных в экспериментах холинэстераз был применен метод субстратно-ингибиторного анализа [9], который показал, что как АХЭ,

так и БУХЭ являются индивидуальными энзимами и не содержат заметных примесей иных эстераз. Кроме того, с препаратом БУХЭ были проведены контрольные опыты с такрином, являющимся специфическим высокоэффективным обратимым конкурентным ингибитором этого энзима [1]. Они показали, что величины констант обратимого ингибирования K_i , определенные с помощью двух субстратов: АТХ и ТНА, совпадают в пределах ошибки опыта и составляют $(1,7 \pm 0,2) \times 10^{-9}$ и $(1,6 \pm 0,1) \times 10^{-9}$ М соответственно. Это подтверждает отсутствие в препарате энзима примесей неспецифических эстераз, влияющих на определение кинетических параметров реакции с помощью ТНА.

Кинетику энзиматического гидролиза субстратов исследовали в среде, содержащей 0,05 М фосфатный буфер с рН $7,50 \pm 0,05$ при температуре $25,0 \pm 0,1$ °С. Начальные скорости энзиматической реакции (v) определяли по скорости увеличения светопоглощения тионитробензойной кислоты, образующейся при взаимодействии продукта реакции тиоспирта с реактивом Элмана (5,5'-дитио-бис[2-нитробензойная кислота], ДТНБ) [10]. В предварительных опытах было установлено, что ЦТА в используемых концентрациях не взаимодействует с реактивом Элмана и не оказывает влияния на учитываемый при расчете скоростей энзиматических реакций неэнзиматический гидролиз субстратов. Измерение оптической плотности растворов производили с помощью спектрофотометра Specol-221 (Германия) при длине волны 412 нм в кинетическом режиме. Скорость холинэстеразного гидролиза субстратов выражали в условных единицах – величине приращения светопоглощения реакционной среды за одну минуту ($\Delta OD/\text{мин}$).

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием t -критерия Стьюдента. Величины кинетических параметров энзиматической реакции: константу Михаэлиса (K_m) и предельную скорость реакции (V), находили графическим методом Лайнуивера-Берка [1], а величины констант обратимого ингибирования (K_i) и активации (K_a) находили графическими методами [1, 11] с использованием программы Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

При изучении взаимодействия катионного детергента ЦТА с холинэстеразами крови человека было показано, что его влияние на АХЭ и БУХЭ в реакциях гидролиза АТХ и ТНА существенно различается. Следует отметить,

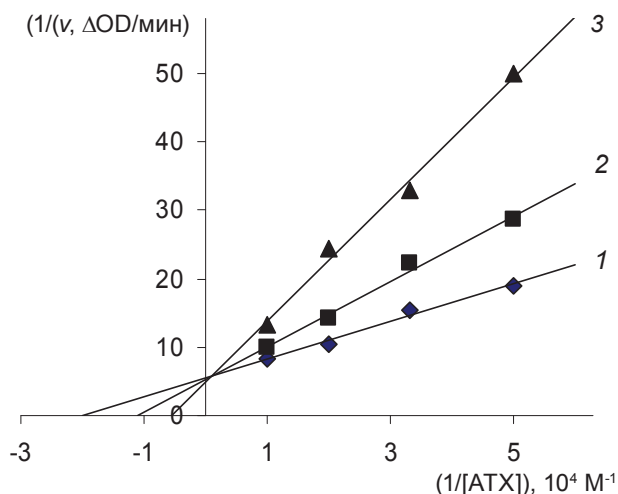


Рис. 1. Зависимость скорости гидролиза АТХ под действием АХЭ от концентрации ЦТА: 1 – контроль; 2 – $[ЦТА] = 2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$; 3 – $[ЦТА] = 5,0 \times 10^{-5} \text{ M}$

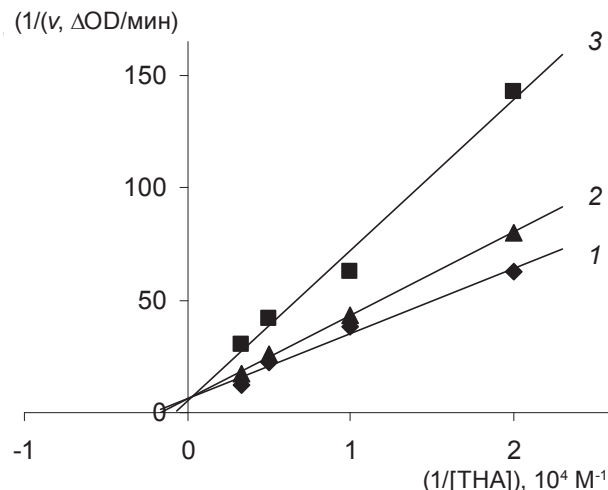


Рис. 2. Зависимость скорости гидролиза ТНА под действием АХЭ от концентрации ЦТА: 1 – контроль; 2 – $[ЦТА] = 2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$; 3 – $[ЦТА] = 5,0 \times 10^{-5} \text{ M}$

что ЦТА является поверхностно-активным веществом (ПАВ) и его молекула содержит заряженную триметиламмонийную «головку» и длинный углеводородный «хвост» (C_{16}). Как и большинство ПАВ, это соединение относительно безвредно для теплокровных животных и человека, однако в некоторых случаях может быть причиной сильных аллергических реакций и представлять серьезную угрозу для здоровья. ЦТА в настоящее время широко используется во многих областях современной медицины и косметологии. Известно, что в силу своей амфифильной природы ПАВ в

растворах склонны к образованию агрегатов – так называемых мицелл и при определенных концентрациях способны вызывать денатурацию протеина. Однако в разбавленных растворах при концентрациях существенно ниже критической концентрации мицеллообразования (ККМ), молекулы подобных веществ находятся в «мономерном» состоянии, образуют истинные растворы и могут взаимодействовать с протеинами как обратимые эффекторы. Величина ККМ для ЦТА составляет $0,85 \times 10^{-3} \text{ M}$ [12].

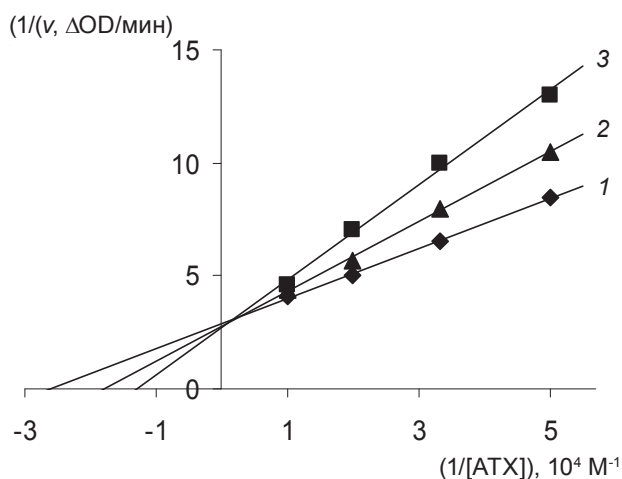


Рис. 3. Зависимость скорости гидролиза АТХ под действием БуХЭ от концентрации ЦТА: 1 – контроль; 2 – $[ЦТА] = 3,0 \times 10^{-6} \text{ M}$; 3 – $[ЦТА] = 5,0 \times 10^{-6} \text{ M}$

Результаты измерения скоростей ферментатического гидролиза АТХ и ТНА в диапазоне концентраций от 2×10^{-5} до $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ и от 5×10^{-5} до $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ соответственно, в контрольных опытах (без ЦТА) и в присутствии ЦТА приведены на рис. 1–4 в координатах Лайнуивера-Берка ($1/v$ от $1/[S]$). Из представленных данных следует, что в изученных системах наблюдаются два типа влияния ЦТА на гидролиз ТНА – торможение (рис. 2) и активация (рис. 4).

В соответствии с общепринятыми представлениями [1], расположение прямых на рис. 1–3 указывает на то, что ЦТА в системах АХЭ–ЦТА–АТХ, АХЭ–ЦТА–ТНА и БуХЭ–ЦТА–АТХ действует как конкурентный обратимый ингибитор – прямые пересекаются в одной точке на оси ординат. Наблюдаемое торможение гидролиза субстратов происходит за счет возрастания величин K_m , определяемых в присутствии ЦТА, при сохранении величин V . На рис. 5–7 представлены результаты определения констант обратимого конкурентного ингибирования (K_i) графическим методом

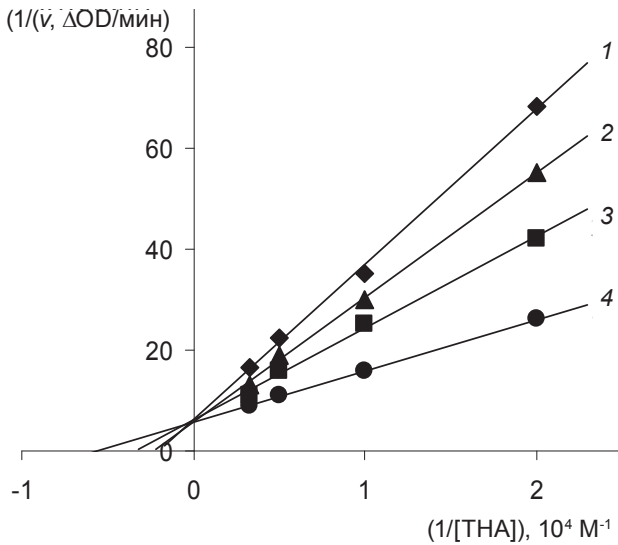


Рис. 4. Зависимость скорости гидролиза ТНА под действием БУХЭ от концентрации ЦТА: 1 – контроль; 2 – $[ЦТА] = 2,5 \times 10^{-6} M$; 3 – $[ЦТА] = 5,0 \times 10^{-6} M$; 4 – $[ЦТА] = 1,0 \times 10^{-5} M$

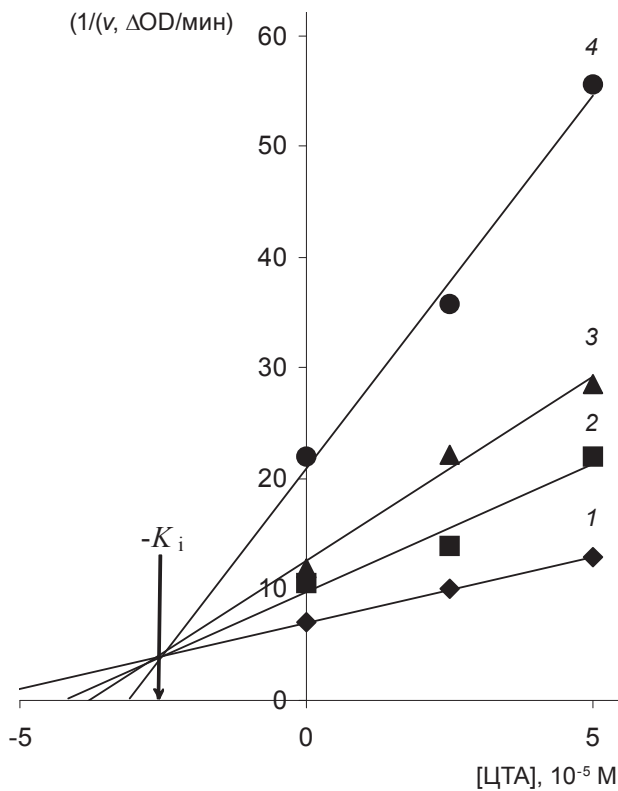


Рис. 5. Графическое определение конкурентной ингибиторной константы K_i в реакции гидролиза АТХ под действием АХЭ в присутствии ЦТА: 1 – $[АТХ] = 1 \times 10^{-4} M$; 2 – $[АТХ] = 5 \times 10^{-5} M$; 3 – $[АТХ] = 3 \times 10^{-5} M$; 4 – $[АТХ] = 2 \times 10^{-5} M$

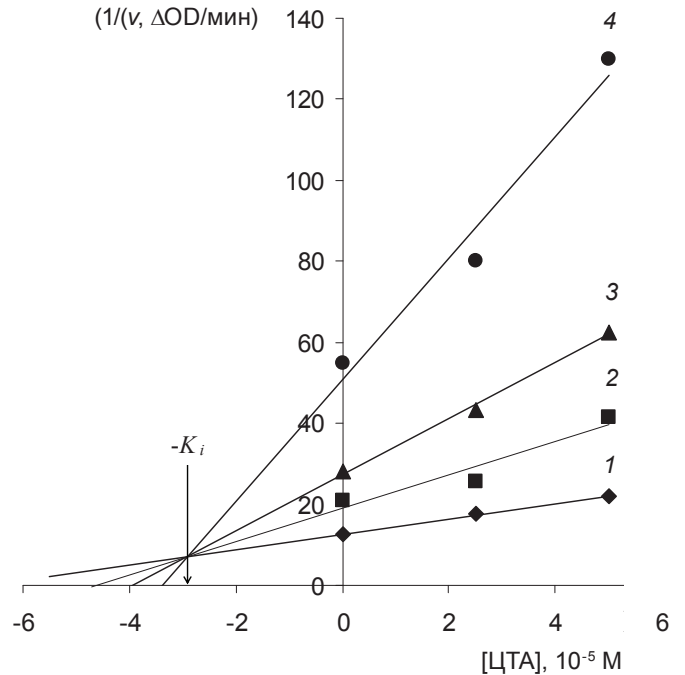


Рис. 6. Графическое определение конкурентной ингибиторной константы K_i в реакции гидролиза ТНА под действием АХЭ в присутствии ЦТА: 1 – $[ТНА] = 1 \times 10^{-4} M$; 2 – $[ТНА] = 5 \times 10^{-5} M$; 3 – $[ТНА] = 3 \times 10^{-5} M$; 4 – $[ТНА] = 2 \times 10^{-5} M$

Диксона [1]. Величины K_i в реакции ингибирования АХЭ, определенные по субстратам АТХ и ТНА, близки между собой и составляют $(2,5 \pm 0,3) \times 10^{-5}$ и $(2,8 \pm 0,3) \times 10^{-5} M$ соответственно (рис. 5 и 6). Величина K_i , определенная по эффекту ингибирования гидролиза АТХ под действием БУХЭ в присутствии ЦТА, составляет $(3,9 \pm 0,4) \times 10^{-6} M$ (рис. 7).

Принято считать, что молекула конкурентного ингибитора связывается тем же участком активного центра энзима, который ответствен за связывание молекулы субстрата, что приводит к блокированию или экранированию определенных межмолекулярных взаимодействий. Как ЦТА так и АТХ имеют в своем составе положительно заряженный метилированный атом азота и конкуренция за «анионный» участок активного центра одной или другой холинэстеразы представляется естественной. Конкурентное ингибирование гидролиза ТНА под действием АХЭ в присутствии ЦТА, вероятно, связано с тем что, ЦТА блокирует активный центр АХЭ таким образом, что создает препятствия для взаимодействия энзима с субстратами различного строения – АТХ и ТНА.

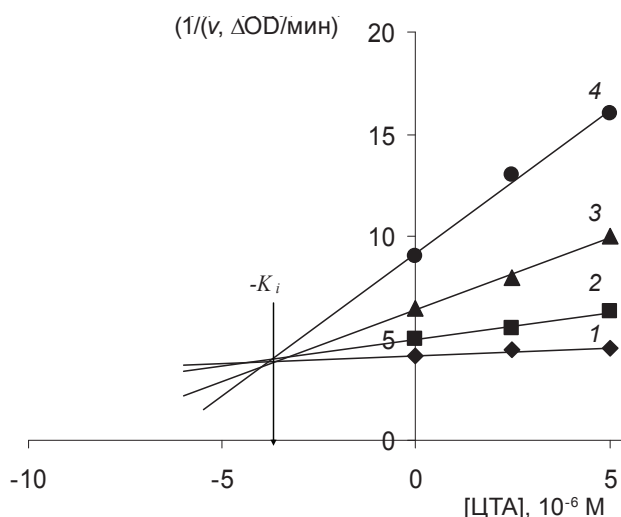
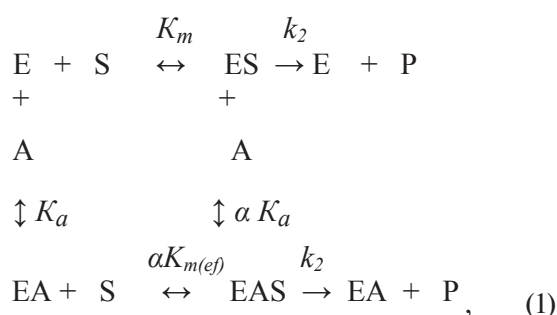


Рис. 7. Графическое определение конкурентной ингибиторной константы K_i в реакции гидролиза АТХ под действием БУХЭ в присутствии ЦТА: 1 – $[АТХ] = 1 \times 10^{-4}$ М; 2 – $[АТХ] = 5 \times 10^{-5}$ М; 3 – $[АТХ] = 3 \times 10^{-5}$ М; 4 – $[АТХ] = 2 \times 10^{-5}$ М

Для системы БУХЭ-ТНА (рис. 4) влияние ЦТА проявляется как ускорение гидролиза субстрата за счет уменьшения величины K_m при сохранении величины V . Эффект активации энзиматической реакции, вероятно, объясняется образованием в реакционной смеси тройных комплексов энзим-субстрат-активатор, описанных в литературе [13], которое приводит к увеличению сродства энзима к субстрату и уменьшению величины определяемой $K_{m(ef)}$. Величина V при этом сохраняется неизменной. Такой тип активации в соответствии с принятой терминологией относится к случаю синергической активации и подробно проанализирован [11, 14]. В соответствии с этими представлениями схему гидролиза субстрата в присутствии синергического активатора можно представить в следующем виде:



где А – активатор ЦТА, EA – комплекс энзим-активатор, EAS – тройной комплекс энзим-активатор-субстрат, α – коэффициент активации, K_a – константа синергической

активации (при $\alpha < 1$), K_m – константа Михаэлиса, измеренная в отсутствие эффектора, $K_{m(ef)}$ – константа Михаэлиса, измеренная в присутствии эффектора.

Уравнение скорости реакции принимает вид:

$$v = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{\alpha K_a \frac{K_a + [A]}{a K_a + [A]} + [S]} \quad (2)$$

Последовательные преобразования уравнения скорости (2) для схемы (1) приводят к формуле (3):

$$K_{m(ef)} = \alpha K_m \frac{K_a + [A]}{a K_a + [A]}, \quad (3)$$

$$\beta = \frac{1}{1 - \frac{K_{m(ef)}}{K_m}} = \frac{1}{1 - \alpha} + \frac{\alpha K_a}{1 - \alpha} \times \frac{1}{[A]}. \quad (4)$$

Очевидно:

$$\beta - 1 = \frac{\alpha K_a}{(1 - \alpha)[A]} + \frac{\alpha}{(1 - \alpha)}. \quad (5)$$

Величина K_a – константа равновесия связывания эффектора свободным энзимом может быть определена как абсцисса пересечения графика зависимости $(\beta - 1)$ от величины $1/[A]$ с осью абсцисс.

На рис. 8 представлен график этой зависимости для реакции БУХЭ с ТНА в присутствии ЦТА. Величина K_a , определенная таким образом, составляет $(4,4 \pm 0,4) \times 10^{-6}$ М.

Различие эффектов, вызываемых ЦТА в реакциях БУХЭ с АТХ и ТНА, ставит вопрос о типах комплексов БУХЭ-ЦТА, проявляющихся в этих реакциях. Величины констант $K_i = (3,9 \pm 0,4) \times 10^{-6}$ М и $K_a = (4,4 \pm 0,4) \times 10^{-6}$ М для систем БУХЭ-ЦТА-АТХ и БУХЭ-ЦТА-ТНА совпадают в пределах ошибки эксперимента. Близость этих значений позволяет предполагать, что структура комплекса БУХЭ-ЦТА в обоих случаях одинакова. Наблюдаемые в эксперименте различия действия ЦТА – торможение реакции с АТХ и активация реакции с ТНА, обусловлены особенностями каталитически активных тройных комплексов энзим-субстрат-эффектор. По-видимому, препятствия, создаваемые молекулой ЦТА для связывания АТХ, в случае БУХЭ не только несущественны, но и предпочтительны для связывания ТНА. Нельзя также исключать, что этому может способствовать изменение конфигурации или заряда макромолекулы

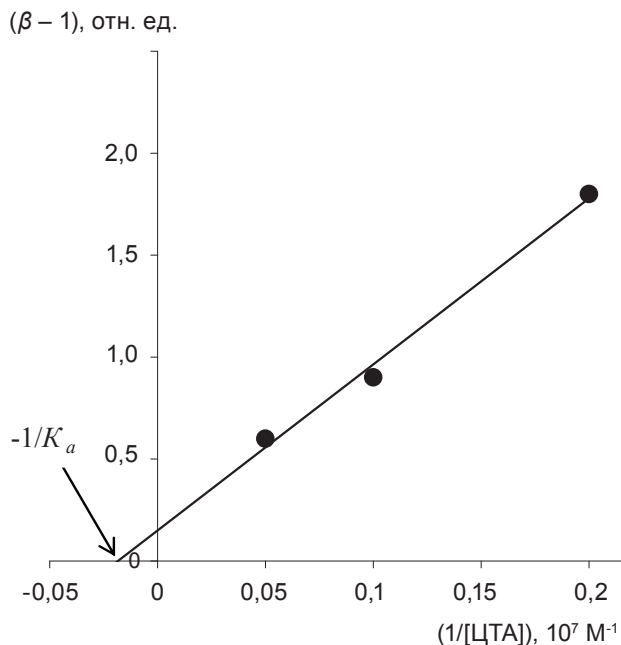


Рис. 8. Графическое определение константы синергической активации K_a реакции гидролиза ТНА в присутствии ЦТА под действием БУХЭ

протеина–энзима, которая может вступать во взаимодействие с молекулой детергента ЦТА.

Активация с помощью ЦТА ферментативного гидролиза ТНА, проявляющаяся в опытах с БУХЭ, пока не имеет строгого объяснения. Однако повторение закономерностей, наблюдаемых ранее для БУХЭ из сыворотки крови лошади с субстратом α -нафтилацетатом, свидетельствует о том, что этот эффект не является экзотической особенностью ранее изученных систем, а является свойством БУХЭ и обусловлен строением ее активного центра. Отсутствие подобного эффекта у АХЭ подчеркивает наличие существенных различий реакционной способности фермент–субстратных комплексов этих родственных ферментов. Следует отметить, что многие исследователи отводят БУХЭ плазмы крови роль «чистильщика» [3], в связи с этим проблемы взаимодействия этого фермента с соединениями, изменяющими его реакционную способность, могут представлять несомненный теоретический и практический интерес.

ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ ЦЕТИЛТРИМЕТИЛАМОНІЮ НА АКТИВНІСТЬ ХОЛІНЕСТЕРАЗ КРОВІ ЛЮДИНИ

Л. П. Кузнєцова, В. А. Самокіш,
О. Є. Сочіліна

Установа Російської академії наук Інститут еволюційної фізіології і біохімії ім. І. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Росія;
e-mail: esoch@iephb.ru

Вивчено вплив катіонного детергенту цетилтриметиламонію на каталітичну активність холінестераз крові людини (ацетилхолінестерази еритроцитів крові і бутирилхолінестерази плазми крові) в реакціях гідролізу α -тіонафтилацетату і ацетилтіохоліну. Показано, що цетилтриметиламоній є оборотним ефектором для обох холінестераз. Це сполучення конкурентно інгібує ферментативний гідроліз субстрату ацетилтіохоліну обома холінестеразами, а в реакціях ферментативного гідролізу субстрату α -тіонафтилацетату виявляє себе як синергічний активатор – в досліді з бутирилхолінестеразою, і як конкурентний оборотний інгібітор – в досліді з ацетилхолінестеразою. Константи інгібування цетилтриметиламонієм ферментативної активності ацетилхолінестерази, визначені за допомогою різних субстратів – ацетилтіохоліну і α -тіонафтилацетату – близькі між собою і складають $(2,5 \pm 0,3) \times 10^{-5}$ і $(2,8 \pm 0,3) \times 10^{-5}$ М відповідно. Бутирилхолінестераза чутливіша до дії цетилтриметиламонію, ніж ацетилхолінестераза. Кінетичні константи, визначені для цього ферменту ефектом інгібування гідролізу ацетилтіохоліну і активації гідролізу α -тіонафтилацетату, також близькі між собою і складають $(3,9 \pm 0,4) \times 10^{-6}$ і $(4,4 \pm 0,4) \times 10^{-6}$ М відповідно.

Ключові слова: α -тіонафтилацетат, ацетилтіохолін, цетилтриметиламоній, активність, інгібування, ацетилхолінестераза еритроцитів людини, бутирилхолінестераза плазми крові людини.

**PECULIARITIES OF THE INFLUENCE
OF CETYLTRIMETHYLAMMONIUM
ON THE HUMAN BLOOD
CHOLINESTERASES ACTIVITY**

*L. P. Kuznetsova, V. A. Samokish,
E. E. Sochilina*

Sechenov Institute of Evolutionary
Physiology and Biochemistry,
Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia;
e-mail: esoch@iephb.ru

S u m m a r y

The influence of cationic detergent cetyltrimethylammonium on the human blood cholinesterases activity (erythrocyte acetylcholinesterase and plasma butyrylcholinesterase) in reactions of hydrolysis of α -thionaphthylacetat and acetylthiocholine is studied. It is shown, that cetyltrimethylammonium is reversible effector for both cholinesterases. This compound competitively inhibited enzymatic hydrolysis of acetylthiocholine by both cholinesterases, and in the reactions of enzymatic hydrolysis α -thionaphthylacetat display as the synergistic activator - in experiments with butyrylcholinesterase, and as the reversible inhibitor - in experiments with acetylcholinesterase. Kinetic constants in reaction of acetylcholinesterase inhibition by cetyltrimethylammonium defined by means of different substrates - α -thionaphthylacetat and acetylthiocholin. They are close among themselves and amount $(2.5 \pm 0.3) \times 10^{-5}$ and $(2.8 \pm 0.3) \times 10^{-5}$ M, accordingly. Butyrylcholinesterase was more sensitive to influence of cetyltrimethylammonium. The kinetic constants defined for this enzyme by the effect of inhibition of acetylthiocholin hydrolysis or activation of α -thionaphthylacetat hydrolysis, are also close among themselves and amount $(3.9 \pm 0.4) \times 10^{-6}$ and $(4.4 \pm 0.4) \times 10^{-6}$ M, accordingly.

Key words: α -thionaphthylacetat, acetylthiocholine, enzymatic hydrolysis, cetyltrimethylammonium, activation, inhibition, human erythrocyte acetylcholinesterase, human plasma butyrylcholinesterase.

1. *Бресткин А. П., Кузнецова Л. П., Моралев С. Н. и др.* Холинэстеразы наземных животных и гидробионтов. – Владивосток: ТИНРО, 1997. – 466 с.
2. *Massoulié J., Bon S.* // *Ann. Rev. Neurosci.* – 1982. – 5. – P. 57–106.
3. *Doctor V. P., Saxena A.* // *Chem. Biol. Interact.* – 2005. – 157–158. – P. 167–171.
4. *Бресткин А. П., Брик И. Л.* // *Биохимия.* – 1967. – 32, вып. 1. – С. 3–12.
5. *Stojan J., Golicnik M., Froment M. T. et al.* // *Europ. J. Biochem.* – 2002. – 269, Issue 4. – P. 1154–1161.
6. *Жуковский Ю. Г., Кузнецова Л. П., Сочилина Е. Е.* // *Укр. биохим. журн.* – 1995. – 67, № 4. – С. 40–46.
7. *Жуковский Ю. Г., Кузнецова Л. П., Сочилина Е. Е., Векслер К. В.* // *Укр. біохім. журн.* – 2004. – 76, № 5. – С. 151–155.
8. *Кузнецова Л. П., Никольская Е. Б., Сочилина Е. Е., Фаддеева М. Д.* // *Ж. эвол. биохим. и физиол.* – 2002. – 38, № 1. – С. 28–31.
9. *Жуковский Ю. Г., Кривченко А. И., Кузнецова Л. П., Сочилина Е. Е.* Установление индивидуальности холинэстеразного домена в препарате энзима. – Орел: “А.В.”, 2008. – 91 с.
10. *Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V., Featherstone R. M.* // *Biochem. Pharmacol.* – 1961. – 7, N 2. – P. 88–95.
11. *Березин И. В., Клёсов А. А.* Практический курс химической и энзиматической кинетики. – Изд. МГУ, 1976. – 320 с.
12. *Ибрагимова А. Р., Кудрявцев Д. Б., Захарова Л. Я. и др.* // *Структура и динамика молекулярных систем.* – 2003. – Выпуск X. Часть 2. – С. 99–102.
13. *Алебян Г. П., Бресткин А. П., Самокиш В. А.* // *Биоорг. химия.* – 1982. – 8, № 4. – С. 478–486.
14. *Березин И. В., Мартинек К.* Основы физической химии энзиматического катализа. – М.: Высшая школа, 1977. – 280 с.

Получено 14.02.2011