

УДК 573.6

Создание высокоэффективного флуоресцентного зонда для изучения биodeградации фармакологических белковых препаратов *in vivo*

С. С. Терехов^{1*}, И. В. Смирнов^{1,4}, О. Г. Шамборант¹, М. А. Зенкова², Е. Л. Черноловская², Д. В. Гладких², А. Н. Мурашев³, И. А. Дьяченко³, В. Д. Кнорре¹, А. А. Белогуров^{1,4,5}, Н. А. Пономаренко¹, С. М. Деев¹, В. В. Власов², А. Г. Габиров^{1,4,5}

¹Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

³Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Пущино, Московская обл.

⁴Казанский федеральный университет, 420008, Казань, Республика Татарстан, ул. Кремлевская, 18

⁵Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

*E-mail: sterekhoff@gmail.com

Поступила в редакцию 31.10.2014

РЕФЕРАТ Рекомбинантные белки стали одними из лидирующих среди современных фармакологических препаратов. Вместе с тем существующие методы анализа фармакокинетики в большинстве своем не учитывают процесс биodeградации белкового препарата. Закономерности биodeградации белкового фармпрепарата позволяют определить основные пути его выведения из организма при проведении доклинических испытаний. Использование флуоресцентных агентов высокой яркости красного и дальне-красного диапазона дает возможность проводить неинвазивные исследования выведения и распределения белковых препаратов в живом организме. Мы предложили использовать метод избыточной конъюгации белков флуорофорами для создания зонда, позволяющего наблюдать биodeградацию рекомбинантной бутирилхолинэстеразы в организме живой мыши. Установлено, что максимум разгорания флуоресценции, отражающей деградацию фермента, наблюдается через 6 ч после внутривенного введения препарата. Показано, что избыточная конъюгация флуорофора приводит к существенному изменению фармакокинетических параметров препарата. Этот факт необходимо учитывать при выборе метода флуоресцентного «биоимиджинга» при проведении фармакокинетических исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биodeградация, бутирилхолинэстераза, фармакокинетика, флуоресцентный зонд, протеолиз, самотушение, *in vivo*-визуализация.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ОФЭКТ – однофотонная эмиссионная компьютерная томография; ПЭТ – позитронная эмиссионная томография; HIV – вирус иммунодефицита человека; rhBChE – рекомбинантная тетрамерная бутирилхолинэстераза человека; PRAD – proline-rich attachment domain, пролин-богатый домен связывания; MMP – matrix metalloproteinase, матриксная металлопротеиназа; sCy5 – Sulfo-Cyanine5; sCy7 – Sulfo-Cyanine7; F_{\max} – относительное разгорание флуоресценции; F_{enz} – интенсивность флуоресценции гидролизованного образца; F_0 – интенсивность флуоресценции образца до протеолитического гидролиза; N – степень модификации препаратов; rhBChE-sCy7 ON – флуоресцирующий конъюгат rhBChE-sCy7 без эффекта самотушения; rhBChE-sCy7 OFF – нефлуоресцирующий конъюгат rhBChE-sCy7 с эффектом самотушения; BSA – бычий сывороточный альбумин; KLH – гемоцианин.

ВВЕДЕНИЕ

Современная фармакокинетика – высокотехнологичная область, использующая самые современные неинвазивные подходы, такие, как однофотонная

эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ), позитронная эмиссионная томография (ПЭТ) и флуориметрия *in vivo* не только для анализа фармакокинетических параметров, но и для определения про-

филя биораспределения и накопления препаратов [1]. В связи с широким внедрением в современные протоколы, применяемые при таких серьезных заболеваниях, как рак [2, 3], аутоиммунные патологии [4] и заболевания крови [5], рекомбинантных белковых препаратов на повестку дня остро встал вопрос изучения биораспределения и биодegradации этих лекарственных средств в организме животного в ходе доклинических испытаний. Обнаружение новых инфракрасных флуоресцентных красителей, обладающих высокой яркостью и позволяющих работать в «окне прозрачности» биологических тканей (700–900 нм), наряду с их коммерческой доступностью, безопасностью и эффективностью, позволило осуществить переход к «биоимиджингу» флуоресценции в качестве одного из наиболее распространенных методов визуализации [6, 7]. На основании результатов визуализации можно сделать вывод о том, в каком органе происходит накопление препарата [8], а также каковы фармакокинетические характеристики его выведения [9] из организма. Для препаратов на основе рекомбинантных белков, обладающих определенной специфической активностью, крайне важно знать, как связано накопление препарата в том или ином органе и его деградация. Знание о закономерностях биодegradации препарата играет особую роль в том числе и потому, что позволяет определить основные пути его выведения.

Цель данной работы состояла в создании зонда, позволяющего определить основные компартменты биодegradации рекомбинантного белка, на примере рекомбинантной бутирилхолинэстеразы, биологического антидота против фосфорорганических ядов нервно-паралитического действия [10, 11]. В основе использованного нами подхода лежит явление самотушения флуорофоров [12]. Суть его заключается в том, что для молекул флуорофоров, обладающих небольшим стоковским сдвигом (порядка 20–30 нм) и расположенных на расстоянии менее 10 нм друг от друга, характерно тушение флуоресценции. Эффективность тушения зависит, в том числе и от способности к агрегации молекул флуорофора в основном за счет π - π - и гидрофобных взаимодействий [13]. Таким образом, избыточная модификация препарата белковой природы, инфракрасным флуорофором, склонным к самотушению, приводит к образованию конъюгата с «выключенной» флуоресценцией, в то время как его деградация и образование пептидных продуктов приведет к «разгоранию» флуоресценции. Аналогичный подход уже нашел применение в визуализации опухолей по наличию MMP-активности, специфических или гиперэкспрессированных рецепторов [14–18], в исследовании активности протеолитических анти-

тел к поверхностному белку HIV; gp120 [19]. В данной работе мы предложили использовать избыточное мечение рекомбинантной бутирилхолинэстеразы для прижизненной визуализации компартментов, ответственных за разложение и выведение препарата, а также для оценки параметров биораспределения и биодegradации фермента.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Белковые препараты, использованные в работе

Рекомбинантная тетрамерная бутирилхолинэстераза человека (rhBChE) была получена в клетках линии CHO-K1, трансфицированных конструкцией pFUSE PRAD-F2A-BChE, в которых одновременно экспрессируется ген пептида тетрамеризации (PRAD) и бутирилхолинэстеразы человека. rhBChE была последовательно очищена методами аффинной хроматографии с использованием сорбента прокаинамидсефарозы на колонке XK10/50 (GE Healthcare, США) и ионообменной хроматографии на колонке MonoQ 5/50 (GE Healthcare, США). Чистота белка составляла более 95% по результатам электрофореза в полиакриламидном геле с последующим окрашиванием красителем Кумасси и окрашиванием на наличие специфической бутирилхолинэстеразной активности по методу Karnovsky и Roots [20]. Коммерчески доступные белки KLH и BSA были получены от фирмы Sigma-Aldrich.

Синтез препаратов флуоресцентно меченных белков

Белки были конъюгированы с различными NHS-активированными флуорофорами класса цианиновых красителей: Sulfo-Cyanine5 (sCy5), Sulfo-Cyanine7 (sCy7) (Lumiprobe). Конъюгацию проводили в 0.1 M NaHCO₃ согласно протоколу производителя. Флуоресцентно меченные белки очищали от продуктов реакции методом гель-фильтрации на колонке HiTrap Desalting (GE Healthcare, США). Флуоресценцию препаратов белков измеряли на приборе Varioscan Flash (Thermo Scientific). Для определения максимального относительного разгорания флуоресценции образцы белков предварительно подвергали протеолизу раствором, содержащим смесь протеаз (1 мг/мл протеиназы K (Fermentas) и 2 мг/мл субтилизина Карлсберг) в фосфатно-солевом буфере pH 7.4 при 37°C в течение 4 ч. Полноту реакции протеолиза оценивали спектрофлуориметрически по выходу на насыщение кривой зависимости интенсивности флуоресценции (RFU) от времени. Относительное разгорание флуоресценции (F_{\max}) вычисляли как отношение разницы интенсивности флуоресценции гидроли-

Таблица 1. Характеристика использованных препаратов конъюгатов белков с флуорофорами

Препарат	N	F_0 , RFU	F_{enz} , RFU	F_{max}
BSA-FITC [23]	25	-	-	3450
KLH-sCy5	380–750	6.25	1140	18100
BSA-sCy5	6.7	2.37	1680	70800
rhBChE-sCy5	30	6.17	1750	28300
BSA-sCy7	6.5	1.8	660	36500
rhBChE-sCy7 OFF	32	2.71	597	21900
rhBChE-sCy7 ON	1	50	50.05	0.1

Примечание. N – степень модификации; F_0 – флуоресценция до протеолитического расщепления; F_{enz} – флуоресценция после протеолитического расщепления.

зованного образца (F_{enz}) и интенсивности флуоресценции образца до протеолитического гидролиза (F_0): $F_{max} = (F_{enz} - F_0)/F_0 \times 100\%$. Степень модификации препаратов (N), т.е. количество групп флуорофора на молекулу белка, определяли путем измерения оптической плотности растворов при длине волны 280 нм ($E^{1\%} = 18$) и при 760 нм исходя из коэффициентов молярного поглощения $240600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для sCy7.

Определение фармакокинетических параметров конъюгатов rhBChE-sCy7

Для оценки концентрации конъюгатов rhBChE в плазме крови использовали три группы мышей линии BALB/c по шесть животных в каждой, которым внутривенно были введены препараты конъюгированной rhBChE (без флуоресцентной метки, rhBChE-sCy7 ON и избыточно конъюгированного препарата rhBChE-sCy7 OFF) в дозе 200 мкг/мышь. Концентрацию BChE в сыворотке крови мышей определяли исходя из ее активности по методу Элмана [21]. Фармакокинетические характеристики препаратов получали исходя из аппроксимации кривой выведения rhBChE в рамках двухкамерной модели [10].

Эксперименты по визуализации *in vivo*

Биораспределение и паттерн деградации rhBChE определяли с использованием препаратов rhBChE-sCy7 OFF и rhBChE-sCy7 ON. Мышам линии BALB/c внутривенно были введены препараты конъюгатов rhBChE-Sulfo-Cyanine7 в дозе 500 мкг/мышь. Систему для оптической визуализации малых животных In Vivo MS FX PRO (Bruker) использовали для оценки распределения BChE и продуктов ее разложения. Для детекции флуоресценции sCy7 использовали фильтры возбуждения и эмиссии 730 и 790 нм соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Метод тушения/разгорания флуоресценции избыточно меченых белковых субстратов за счет их про-

теолитической деградации был успешно использован для исследования биокатализаторов с невысоким уровнем протеолитической активности [22] или анализа малых концентраций ферментов [23].

Очевидно, что использование флуоресцеина в качестве источника аналитического сигнала неприменимо в случае исследований *in vivo*, вследствие высокого фона органов и тканей. Для исключения этого недостатка мы применили конъюгацию белковых молекул с красителями sCy5, sCy7 в различных условиях.

Дополнительно мы предположили, что применение «красных» и «дальне-красных» флуорофоров позволит получить более чувствительные зонды для оценки протеолитической активности за счет более эффективного разгорания флуоресценции. Для анализа неспецифической активности мы использовали классические белки-субстраты – бычий сывороточный альбумин (BSA) и гемоцианин (KLH), а также бутирилхолинэстеразу – фармакологически важный препарат, биологический антидот при отравлениях фосфорорганическими токсинами. В результате были получены препараты KLH-sCy5, BSA-sCy5, rhBChE-sCy5, BSA-sCy7, rhBChE-sCy7 ON и rhBChE-sCy7 OFF (табл. 1).

Полученные конъюгаты подвергали ферментативному гидролизу для определения эффективности разгорания флуоресценции. Все флуоресцентные субстраты характеризовались высоким уровнем максимального разгорания флуоресценции (F_{max}) (табл. 1), превышающим уровень классического субстрата BSA-FITC. Наибольшей эффективностью отличается препарат rhBChE-sCy5, в котором флуоресценция увеличивалась более чем в 700 раз.

Препарат rhBChE-sCy7 ON обладал одинаковой флуоресценцией до и после протеолиза, в то время как флуоресценция образца rhBChE-sCy7 OFF была значительно потушена и возрастала в 220 раз после протеолитического расщепления. Таким образом, препарат rhBChE-sCy7 OFF может служить зондом

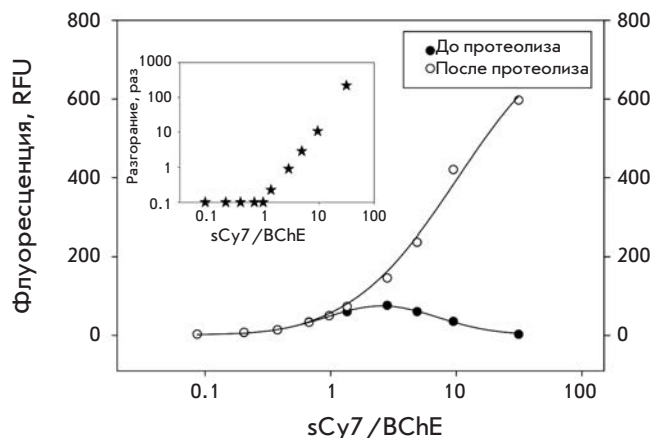


Рис. 1. Анализ вариантов конъюгатов бутирилхолинэстеразы с различной степенью модификации флуорофором sCy7

для оценки протеолитической деградации препарата в фармакокинетических экспериментах. Нами были проанализированы несколько вариантов избыточной конъюгации бутирилхолинэстеразы для получения максимально эффективного флуоресцентного зонда. Мы опирались на два критерия отбора – относительное разгорание флуоресценции и удельная активность фермента после модификации (рис. 1). В результате был выбран вариант со степенью модификации 32, при этом нам удалось добиться сохранения более 70% специфической активности.

Фармакокинетические исследования препаратов rhBChE-sCy7 ON и rhBChE-sCy7 OFF

При исследовании фармакокинетических параметров препаратов rhBChE-sCy7 ON и rhBChE-sCy7 OFF мы воспользовались уникальной возможностью оценки количества бутирилхолинэстеразы в кровотоке кинетическим и флуоресцентным методами одновременно. Действительно, в классическом способе оценки фармакокинетических параметров белковых препаратов используется либо прямой радиоактивный метод, либо косвенные методы (например, ИФА).

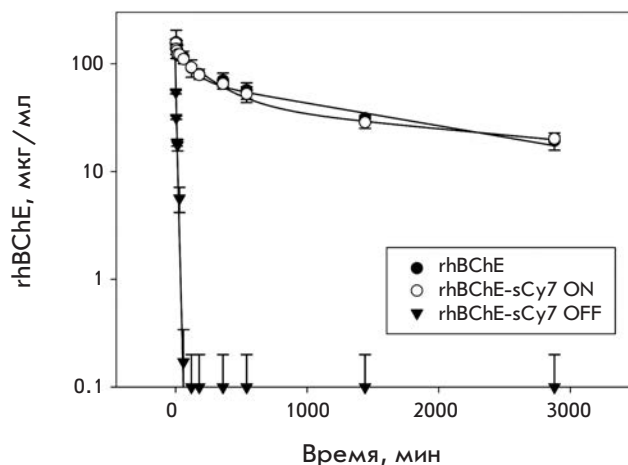


Рис. 2. Анализ фармакокинетических параметров выведения препаратов бутирилхолинэстеразы и ее конъюгатов с флуорофором sCy7

Однако все эти методы зачастую свидетельствуют только о наличии части белка (содержащей радиоактивную метку либо эпитоп связывания со специфическим антителами соответственно), но не доказывают присутствия активного белкового препарата. В случае бутирилхолинэстеразы биологическим антитодом является только активный фермент, следовательно, наблюдая за изменением активности препарата в кровотоке, можно судить о его «реальных» фармакокинетических параметрах. Флуоресцентный зонд указывает на наличие как целого белка, так и его фрагментов, таким образом, сравнение профилей выведения, наблюдаемых двумя различными методами, свидетельствует о деградации препарата на фоне его элиминации из организма.

Как показано на рис. 2 и в табл. 2, характер и параметры выведения препарата rhBChE-sCy7 ON такие же, как у фермента, не подвергнутого модификации, в то время как поведение препарата rhBChE-sCy7 OFF в организме кардинально изменено. Скорость выведения экстремально увеличивается (табл. 2).

При анализе профилей выведения препарата, определяемых по флуоресценции в различные про-

Таблица 2. Фармакокинетические параметры бутирилхолинэстеразы и ее конъюгатов с флуорофором sCy7

Параметры	rhBChE	rhBChE-sCy7 ON	rhBChE-sCy7 OFF
$\tau_{1/2}$ disr, мин	100 ± 40	140 ± 50	6 ± 2
$\tau_{1/2}$ el, мин	1600 ± 300	2200 ± 400	
MRT, мин	2400 ± 600	2700 ± 700	9 ± 3

межутки времени после введения препарата (рис. 3), установлено, что максимальный уровень флуоресценции наблюдается в промежутке 1.5–8 ч после введения. Можно утверждать, что в это время достигается максимум накопления препарата в печени, где и происходит активная деградация фермента, что отражается в увеличении флуоресценции (рис. 4). Фармакокинетическая кривая выведения rhBChE-sCy7 ON с использованием флуоресцентной детекции (рис. 3) не имеет статистически значимых отличий от аналогичной кривой выведения rhBChE-sCy7 ON, определенной по ферментативной активности (рис. 2). Следовательно, флуоресцентная детекция распределения фермента адекватно отражает накопление rhBChE в том или ином компартменте. В то же время сравнение аналогичных кривых для препарата rhBChE-sCy7 OFF очевидно свидетельствует о наличии двух различных процессов: 1 – быстрое выведение rhBChE-sCy7 OFF из кровотока (приводящее к быстрой потере активности rhBChE в кровотоке, но не сопровождаемое ростом флуоресценции), не связанное с деградацией rhBChE-sCy7 OFF; 2 – медленная деградация препарата rhBChE-sCy7 OFF в месте накопления (при нулевой активности rhBChE в кровотоке флуоресценция возрастает и достигает своих максимальных значений).

Результаты оценки биораспределения препаратов rhBChE-sCy7 ON и rhBChE-sCy7 OFF в органах мыши, полученные в условиях измерения *in vivo*, приведены на рис. 4. Как следует из рис. 4, оба препарата в основном накапливаются в печени, почках и мочевом пузыре. Основным органом, отвечающим за деградацию фермента, является печень, и максимум разгорания флуоресценции, отражающей деградацию фермента, наблюдается через 6 ч после внутривенного введения препарата, продукты разложения попадают в кровь и выводятся преимущественно почками. Следовательно, данные прижизненного распределения белкового препарата в основном подтверждают наблюдения, полученные на предыдущих этапах (см. рис. 2, 3, табл. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Флуоресцентные зонды являются простым и очень чувствительным методом детекции протеолитической активности. С развитием химии флуоресцентных красителей появилась возможность создавать субстраты с высоким уровнем флуоресценции и низким уровнем фонового сигнала. Нам удалось получить панель флуоресцентных субстратов на основе белков, избыточно конъюгированных флуорофорами Sulfo-Cyanine5 и Sulfo-Cyanine7, для лучшего из которых, BSA-sCy5, достигнуто 700-кратное разгорание флуоресценции.

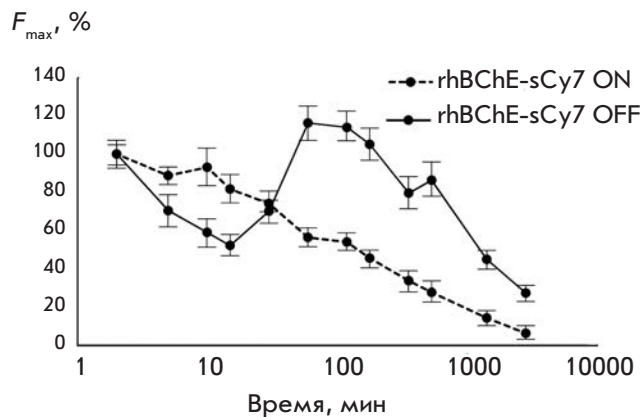


Рис. 3. Анализ кинетики выведения конъюгатов бутирилхолинэстеразы с sCy7, наблюдаемых по флуоресценции

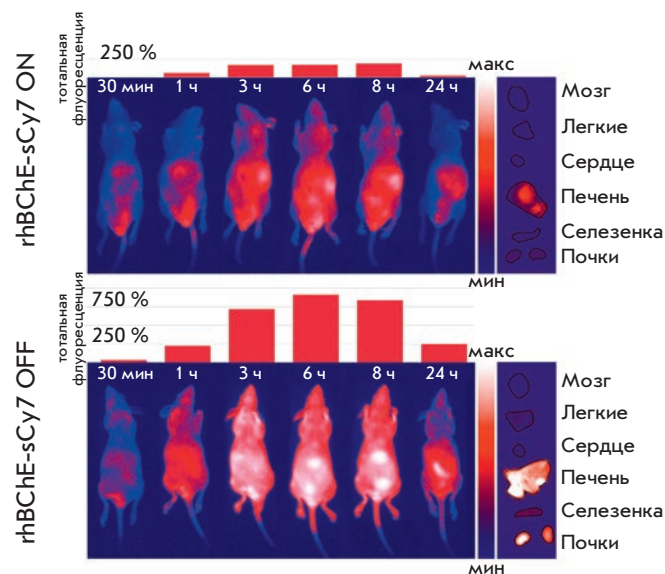


Рис. 4. Анализ биораспределения препаратов конъюгатов бутирилхолинэстеразы с флуорофором sCy7 методом флуоресцентного «биоимиджинга»

Использование избыточно меченого препарата для прижизненной визуализации органов и тканей, ответственных за разложение и выведение терапевтических препаратов, позволяет более полно охарактеризовать поведение белковых препаратов в организме. Очевидно, что попытки улучшить фармакокинетические параметры потенциальных лекарственных средств должны учитывать характер и место деградации потенциального лекарства. Использование методов увеличения времени нахождения препарата в кровотоке совместно с попытками

сократить скорость накопления препарата в печени может помочь в создании лекарственных средств пролонгированного действия. Стоит отметить, что это универсальный подход, который позволяет изучать деградацию любого белка или достаточно крупного пептида *in vivo*. Вместе с тем необходимо учитывать, что избыточное мечение может кардинальным образом изменить фармакокинетические характеристики и способ выведения белкового препарата [24], и это необходимо учитывать при выборе метода флуоресцентного «биоимиджинга» при проведении фармакокинетических исследований. Предложенный подход может оказаться крайне актуальным при проведении сравнительных доклинических исследований панели схожих рекомбинантных белковых препаратов и выбора оптимального кандидата с мишень-направленным действием. ●

Исследования проведены при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI57614X0184), Президиума

Российской академии наук «Молекулярная и клеточная биология», ГК Минпромторга России (№ 13411.1008799.13.128 шифр «2.1 Антидот 2013») и персональной стипендии Президента России СП-2477.2013.4 (И.С.), гранта Президента РФ по поддержке ведущих научных школ НШ-2064.2014.14 «Химические основы биокатализа», программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 24 «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов», проект «Нанолечения для лечения нейродегенеративных заболеваний, сконструированные на основе фрагментов основного белка миелина, компартиментализованные в липосомные контейнеры», РФФИ (14-04-00647 А, 14-04-31207 мол_а), РФФИ (14-24-00106). Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hoppin J., Orcutt K.D., Hesterman J.Y., Silva M.D., Cheng D., Lackas C., Ruscowski M. // JPET. 2011. V. 337. № 2. P. 350–358.
- Balandin T.G., Edelweiss E., Andronova N.V., Treshalina E.M., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. // Invest. New Drugs. 2011. V. 29. P. 22–32.
- Sreenivasan V.K., Stremovskiy O.A., Kelf T.A., Heblinski M., Goodchild A.K., Connor M., Deyev S.M., Zvyagin A.V. // Bioconjugate Chem. 2011. V. 22. № 9. P. 1768–1775.
- Stepanov A.V., Belogurov A.A. Jr., Ponomarenko N.A., Stremovskiy O.A., Kozlov L.V., Bichucher A.M., Dmitriev S.E., Smirnov I.V., Shamborant O.G., Balabashin D.S. // PLoS One. 2011. V. 6. № 6. e20991.
- Orlova N.A., Kovnir S.V., Vorobiev I.I., Gabibov A.G., Vorobiev A.I. // Acta Naturae. 2013. V. 5. № 2(17). P. 19–39.
- Yi X.M., Wang F.L., Qin W.J., Yang X.J., Yuan J.L. // Int. J. Nanomedicine. 2014. V. 9. № 1. P. 1347–1365.
- Vonwil D., Christensen J., Fischer S., Ronneberger O., Shastri V.P. // Mol. Imaging Biol. 2013. V. 16. № 3. P. 350–361.
- Sato K., Watanabe R., Hanaoka H., Harada T., Nakajima T., Kimb I., Paik C.H., Choyke P.L., Kobayashi H. // Mol. Oncology. 2014. V. 8. № 3. P. 620–632.
- Dobosz M., Strobel S., Stubenrauch K.-G., Osl F., Scheuer W. // J. Biomed. Optics. 2014. V. 19. № 1. P. 16022.
- Ilyushin D.G., Smirnov I.V., Belogurov A.A., Dyachenko I.A., Zharmukhamedova T.Iu., Novozhilova T.I., Bychikhin E.A., Serebryakova M.V., Kharybin O.N., Murashev A.N., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. № 4. P. 1243–1248.
- Ilyushin D.G., Haertley O.M., Bobik T.V., Shamborant O.G., Surina E.A., Knorre V.D., Masson P., Smirnov I.V., Gabibov A.G., Ponomarenko N.A. // Acta Naturae. 2013. V. 5. № 1(16). P. 73–84.
- Kobayashi H., Choyke P.L. // Acc. Chem. Res. 2011. V. 44. № 2. P. 83–90.
- Zhegalova N.G., He S., Zhou H., Kim D.M., Berezin M.Y. // Contrast Media Mol. Imaging. 2014. V. 9. № 5. P. 355–362.
- Moin K., Sameni M., Victor B.C., Rothberg J.M., Mattingly R.R., Sloane B.F. // Methods Enzymol. 2012. V. 506. P. 175–194.
- Hama Y., Urano Y., Koyama Y., Kamiya M., Bernardo M., Paik R.S., Shin I.S., Paik C.H., Choyke P.L., Kobayashi H. // Cancer Res. 2007. V. 67. № 6. P. 2791–2799.
- Akers W.J., Xu B., Lee H., Sudlow G.P., Fields G.B., Achilefu S., Edwards W.B. // Bioconjugate Chem. 2012. V. 23. № 3. P. 656–663.
- Vinita A.M., Sano K., Yu Z., Nakajima T., Choyke P.L., Ptaszek M., Kobayashi H. // Bioconjugate Chem. 2012. V. 23. № 8. P. 1671–1679.
- Springa B.Q., Abu-Yousifa A.O., Palanisamia A., Rizvia I., Zhenga X., Maia Z., Anbila S., Searsa R. B., Mensaha L.B., Goldschmidta R., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. № 10. P. E933–E942.
- Ponomarenko N.A., Vorobiev I.I., Alexandrova E.S., Reshetnyak A.V., Telegin G.B., Khaidukov S.V., Avalle B., Karavanov A., Morse H.C. 3rd, Thomas D. // Biochemistry. 2006. V. 45. № 1. P. 324–330.
- Karnovsky M.J., Roots L. // J. Histochem. Cytochem. 1964. V. 12. P. 219–221.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. Jr., Feather-Stone R.M. // Biochem. Pharmacol. 1961. V. 7. P. 88–95.
- Ponomarenko N.A., Pillet D., Paon M., Vorobiev I.I., Smirnov I.V., Adenier H., Avalle B., Kolesnikov A.V., Kozyr A.V., Thomas D., et al. // Biochemistry. 2007. V. 46. № 50. P. 14598–14609.
- Voss E.W., Workman C.J., Mummert M.E. // Biotechniques. 1996. V. 20. № 2. P. 286–291.
- Sano K., Mitsunaga M., Nakajima T., Choyke P.L., Kobayashi H. // Breast Cancer Res. 2012. V. 14. № 2. R61.