

УДК 577.152.34/ 544.478.3

**І. І. Романовська¹, О. В. Севастьянов¹, Є. А. Шестеренко¹,
А. А. Крисько¹, Ю. А. Шестеренко¹, В. А. Топтіков²**¹Фізико-хімічний інститут імені О.В. Богатського НАН України, Люстдорфська дор.,
86, Одеса, 65080, Україна, (048)7659431, e-mail: romairina@gmail.com²Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, вул. Дворянська, 2,
Одеса, 65082, Україна

КАРБОКСИЛЕСТЕРАЗИ ГОМОГЕНАТІВ ТРАВНИХ ЗАЛОЗ *RAPANA VENOSA*

Мета: Вивчити біохімічні і фізико-хімічні властивості карбоксилестераз гомогенатів стравохідної залози і гепатопанкреасу молюска *Rapana venosa*, особливості енантіоселективного ферментативного гідролізу естеру 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону, потенційного анксиолітичного і снодійного засобу. **Методи:** травні залози *Rapana venosa* гомогенізували і визначали вміст білка за методом Лоурі-Хартрі, естеразну активність за 1- і 2- нафтилацетатами. Ферментативний гідроліз естеру 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону проводили впродовж 2,5 год в розчині диметилсульфоксиду: Na-фосфатний буфер, 0,0167 М, рН 7,0, в об'ємних співвідношеннях 2:3, при температурі 37 °С. Визначення енантіомерного надлишку здійснювали за допомогою вискоефективної рідинної хроматографії, використовуючи систему SHIMADZU, що оснащена колонкою ChiraDex HR 5 μ m(4mm $\times$ 250mm). **Результати:** Показано, що естеразна активність гомогенатів гепатопанкреасу і стравохідної залози за 2-нафтилацетатом, як субстратом, в 3,6 рази та в 6,7 рази більша, ніж за 1- нафтилацетатом, відповідно. Належність естераз в гомогенатах до родини карбоксилестераз підтверджена повним пригніченням їх активності селективним інгібітором карбоксилестераз ди-(*n*-нітрофеніл)-фосфатом (2,0 ммоль/дм³). Показано, що рН-оптимуми естеразної активності гомогенатів стравохідної залози і гепатопанкреасу становлять 7,5, і 5,5, відповідно. Встановлено особливості гідролізу естеру 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону, що каталізується карбоксилестеразами у складі гомогенатів травних залоз *Rapana venosa*. Показано переважне утворення *R*-енантіомеру субстрату (енантіомерний надлишок *R*-енантіомеру становив 42%). **Висновки:** Виявлена регіоселективність відносно 1-, 2-нафтилацетатів та енантіоселективність карбоксилестераз естеру 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону.

Ключові слова: карбоксилестераза, травні залози *Rapana venosa*, регіоселективність, енантіоселективність.

Відомо, що чужорідні види можуть становити серйозну загрозу для біорізноманіття, сталого розвитку та охорони довкілля. *Rapana venosa* є хижим черевоногим молюском і являє реальну небезпеку для водних екосистем Чорного моря, крім того, вона набула статусу виду світового розповсюдження

© І. І. Романовська¹, О. В. Севастьянов¹, Є. А. Шестеренко¹, А. А. Крисько¹, Ю. А. Шестеренко¹,
В. А. Топтіков², 2018



[1,15]. Одже, перспективні біотехнологічні дослідження щодо використання даного молюска як нового економічного природного джерела сировини для отримання різноманітних біологічно активних речовин.

В літературі є дані про наявність карбоксилестеразної активності у молюсків (Mollusca) [5, 6, 9, 13], але роботи, присвячені вивченню карбоксилестераз молюска *Rapana venosa*, майже відсутні [15, 16].

Карбоксилестераза (КФ 3.1.1.1) ссавців є одним з найбільш досліджуваних ферментів, що застосовуються для отримання енантиомерів лікарських речовин. Карбоксилестераза має низку позитивних властивостей: широку субстрату специфічність і високу стереоселективність [3, 8], разом з тим недоліками застосування ферменту є висока вартість комерційного препарату. У зв'язку з цим актуальним є пошук більш доступних джерел отримання карбоксилестерази.

Відомо, що енантиомери мають однакові хімічні властивості, але можуть мати істотні відмінності у фармакологічних властивостях [12]. Сьогодні на світовому фармацевтичному ринку представлена достатня кількість лікарських препаратів, що випускаються у вигляді окремого енантиомеру. Їх перевагами є менша токсичність, та знижене дозування порівняно з рацематами [4].

Бенздіазепіни мають широкий спектр фармакологічних властивостей: анксиолітичні, гіпноседативні, протисудомні, міорелаксантні та ін. [11]. Тому пошук, синтез і дослідження фармакологічних властивостей нових представників бенздіазепінового ряду є актуальним завданням. Оскільки деякі з них є рацематами, а хімічні методи розділення пов'язані з низкою труднощів, перспективною є розробка доступніших біотехнологічних методів отримання енантиомерів.

Тому перспективним є дослідження карбоксилестеразної активності травних залоз (стравохідної залози і гепатопанкреасу) молюска *Rapana venosa* та визначення можливості застосування отриманих ферментних препаратів для здійснення енантиоселективного гідролізу естерів 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону, потенційних анксиолітичних і снодійних засобів.

Метою роботи було виявити біохімічні і фізико-хімічні властивості карбоксилестераз гомогенатів стравохідної залози і гепатопанкреасу молюска *Rapana venosa* та особливості енантиоселективного ферментативного гідролізу естеру 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону.

Матеріали та методи.

В роботі використовували *Rapana venosa*, зібрану в весняний період 2017 р. в районі Малого Фонтану в Одеській затоці і надану співробітниками кафедри генетики та молекулярної біології ОНУ імені І. І. Мечникова. Застосовували три вибірки по 10 молюсків з однаковим відношенням статей. З молюсків було виділено 2 травні залози: гепатопанкреас та стравохідна. Гомогенати готували на Na-фосфатному 0,0167 М буферному розчині, рН 7,0, при 10 ходах поршня і 1000 обертів за хвилину. У виділених гомогенатах визначали вміст білка за методом Лоурі в модифікації Хартрі [7], естеразну активність (за стандартними субстратами: 1- та 2-нафтилацетатами) [10].

Вплив селективного інгібітору карбоксилестераз ди-(*n*-нітрофеніл)-фос-



фату на ферментативну активність карбоксилестераз гомогенатів травних залоз визначали в діапазоні концентрацій 0,20–2,0 ммоль/дм³.

Вплив рН інкубаційного середовища на карбоксилестеразну активність гомогенатів вивчали в середовищі диметилсульфоксид: буферний розчин при рН 3,5–9,5; $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Визначення температурного оптимуму карбоксилестеразної активності гомогенатів проводили в інтервалі $t\ 20\text{--}75\text{ }^{\circ}\text{C}$ в умовах рН-оптимуму. Ступінь гідролізу 3-ацетокси-5-феніл-7-бром-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону оцінювали за зменшенням кількості естерних груп спектрофотометрично гідроксаматним методом при $\lambda\ 540\text{ нм}$ [17]. Ферментативний гідроліз 3-ацетокси-5-феніл-7-бром-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону проводили протягом 2,5 годин в розчині диметилсульфоксид: Na-фосфатний буфер, 0,0167 М, рН 7,0, в об'ємних співвідношеннях 2:3, при температурі $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ до 50% трансформації естеру.

Виділення нетрансформованого енантіомеру вихідної сполуки з реакційного середовища після проведення гідролізу проводили екстракцією хлороформом з подальшим розділенням методом препаративної тонкошарової хроматографії (носій кізельгель 60 GF254, «Merck»). Визначення енантіомерного надлишку за допомогою ВЕРХ (високоєфективна рідинна хроматографія), використовуючи систему SHIMADZU (контролер системи CBM-20A; вакуумний дегазатор DGU-20 A5; насос високого тиску LC 20 AD UFLS, оснащений 4-канальним градієнтним блоком низького тиску; термостат колонок CTO-20A; діодно-матричний детектор SPDМ20A), що оснащена колонкою ChiraDex HR 5 μm (4mm $\times$ 250mm). Енантіомерний надлишок розраховували за формулою: $(\text{EH}) = (\text{частка енантіомера А} - \text{частка енантіомера В}) \times 100\%$.

Дані експериментів піддавали статистичному опрацюванню та розраховували значення середньої стандартної похибки експерименту [2].

Результати та їх обговорення

З моллюска *Rapana venosa* отримані гомогенати стравохідної залози і гепатопанкреасу з вмістом білка $317 \pm 1,4\text{ мг/г}$ тканини і $292 \pm 16,1\text{ мг/г}$ тканини, відповідно. Дослідження естеразної активності показало, що естеразна активність гомогенатів гепатопанкреасу і стравохідної залози за 2-нафтилацетатом, як субстратом, в 3,6 рази та в 6,7 рази більша ніж за 1- нафтилацетатом, відповідно (рис. 1). Отримані дані свідчать про більшу регіоселективність карбоксилестераз травних залоз *Rapana venosa* до 2-нафтилацетату.

Належність естераз в гомогенатах травних залоз *Rapana venosa* до родини карбоксилестераз підтверджена повним пригніченням їх естеразної активності селективним інгібітором карбоксилестераз ди-(п-нітрофеніл)-фосфатом (2,0 ммоль/дм³) (рис. 2).

Було вивчено фізико-хімічні характеристики виділених гомогенатів для визначення оптимальних умов прояву максимальної активності (рис. 3 а,б). Встановлено, що рН-оптимум естеразної активності стравохідної залози становив 7,5; гепатопанкреасу – 5,5. Вивчення рН-профілю стравохідної залози виявило широкий діапазон збереження високої ферментативної активності (рН 3,5–8,0). Визначення термопрофілю активності гомогенатів показало, що термооптимум естеразної активності стравохідної залози становив $37\text{--}40\text{ }^{\circ}\text{C}$, а гепатопанкреасу $45\text{ }^{\circ}\text{C}$.



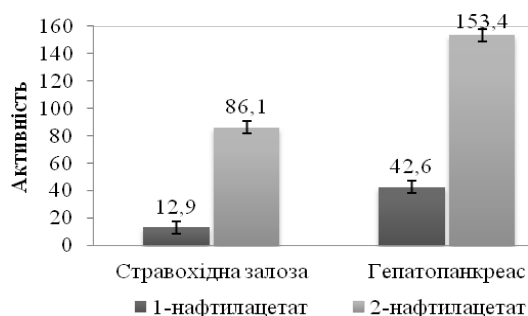


Рис. 1. Естеразна активність гомогенатів травних залоз *Rapana venosa* (нмоль нафтолу/мг білка за хв)

Fig. 1. Esterase activity of homogenates of *Rapana venosa* digestive glands (nmole of naphthol per mg protein per minute)

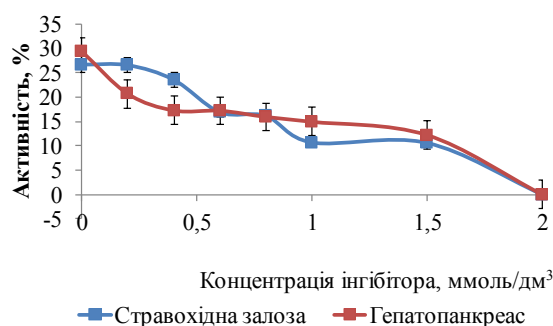


Рис. 2 Інгибування естеразної активності гомогенатів травних залоз *Rapana venosa* біс-(*p*-нітрофеніл)-фосфатом

Fig. 2. Inhibition of esterase activity of the digestive glands homogenates of *Rapana venosa* by bis-(*p*-nitrophenyl)-phosphate

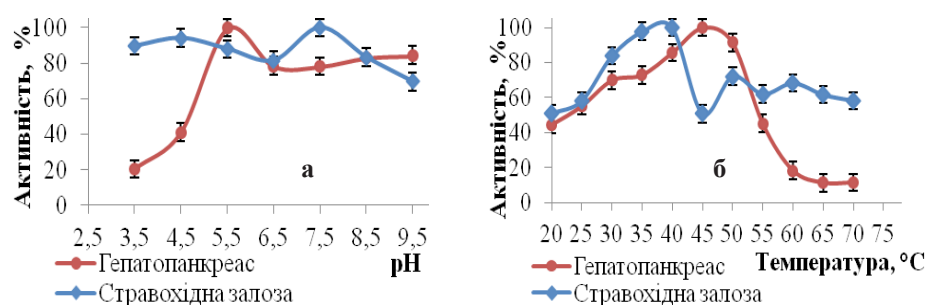


Рис. 3. Вплив pH (а) і температури (б) інкубаційного середовища на естеразну активність гомогенатів травних залоз *Rapana venosa*

Fig. 3. Effect of pH (a) and temperature (б) of the incubation medium on esterase activity of *Rapana venosa* digestive glands homogenates

Вперше нами було здійснено енантіоселективний гідроліз естеру 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону за допомогою карбоксилестераз *Rapana venosa*. Об'єктом досліджень був 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-он синтезований у відділі медичної хімії ФХІ імені О. В. Богатського НАН України [14]. З використанням гомогенатів стравохідної залози і гепатопанкреасу проведено енантіоселективний гідроліз 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону з 50% ступенем трансформації (рис. 4).

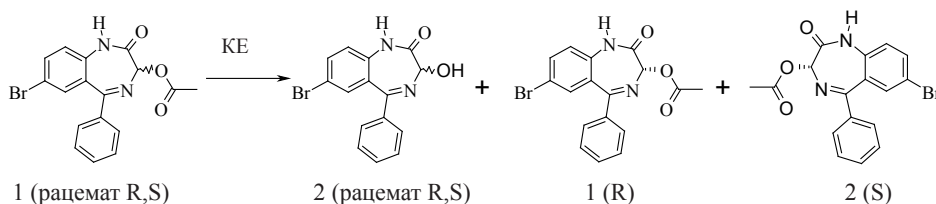


Рис. 4. Схема гідролізу субстрату гомогенатами травних залоз рапани *Rapana venosa* (KE – карбоксилестерази)

Fig. 4. Scheme of the substrate hydrolysis by *Rapana venosa* digestive glands homogenates

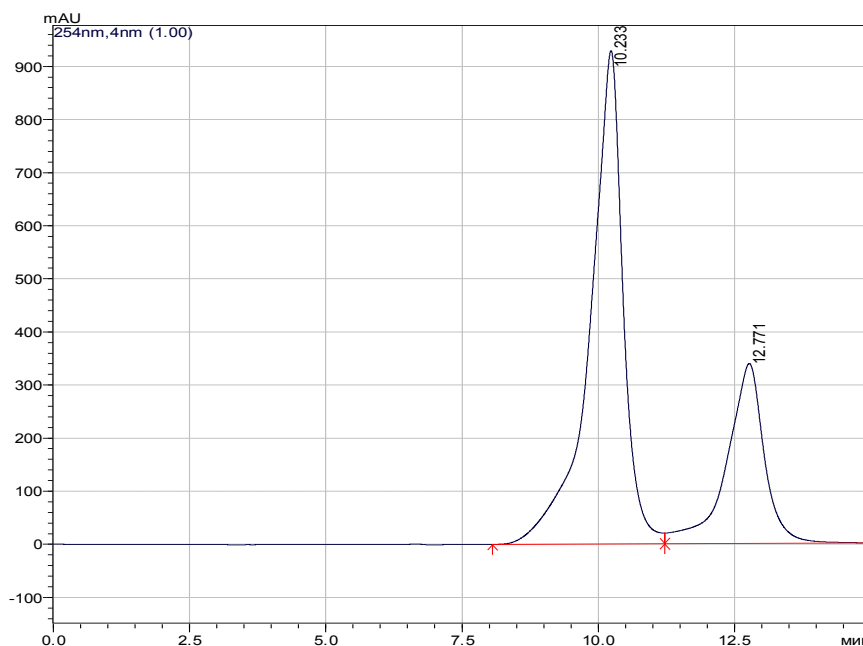


Рис. 5. Хроматограма енантімерів 3-ацетокси-5-феніл-7-бром-1,2-дигідрів 3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону після гідролізу з використанням гомогенатів травних залоз *Rapana venosa*

Fig. 5. Chromatogram of 3-acetoxy-5-phenyl-7-bromo-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-one enantiomers after hydrolysis with using *Rapana venosa* digestive glands homogenates

В результаті гідролізу утворюється відповідне 3-гідроксипохідне (сполука 2), структура якого підтверджена методом мас-спектрометрії. Відомо, що сполука 2 піддається швидкій рацемізації в умовах інкубаційного середовища [14]. Методом ВЕРХ нами встановлена присутність двох енантіомерів естеру 1 (рис. 5) в співвідношенні R:S = 71:29 при використанні карбоксилестераз гомогенатів обох травних залоз. Тобто енантіомерний надлишок R-енантіомеру становив 42 %.

Переважання R-енантіомеру в суміші свідчить про більшу специфічність карбоксилестераз гомогенатів гепатопанкреасу і стравохідної залози до S-енантіомеру субстрату.

Показана більша активність естераз гомогенатів стравохідної залози *Rapana venosa* у кислому середовищі (pH 3,5–5,5) та за високих температур (55–70 °C), ніж така гепатопанкреасу. Доведено приналежність досліджуваних ензимів гомогенатів стравохідної залози та гепатопанкреасу до родини карбоксилестераз. Встановлено, що естеразна активність травних залоз гомогенатів *Rapana venosa*, визначена за 2-нафтилацетатом, перевищує таку за 1-нафтилацетатом в 3,6 та в 6,7 раз, відповідно. В гідролізі 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону з використанням гомогенатів травних залоз *Rapana venosa* показано переважне утворення R-енантіомеру субстрату (енантіомерний надлишок R-енантіомеру становив 42 %).

**И. И. Романовская¹, О. В. Севастьянов¹, Е. А. Шестеренко¹,
А. А. Крысько¹, Ю. А. Шестеренко¹, В. А. Топтиков²**

¹Физико-химический институт имени А. В. Богатского НАН Украины,
Люстдорфская дор., 86, Одесса, 65080, Украина, тел.: +38 (048) 765 94 31,
e-mail: romairina@gmail.com

²Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, ул. Дворянская, 2,
Одесса, 65082, Украина

КАРБОКСИЛЭСТЕРАЗЫ ГОМОГЕНАТОВ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ЖЕЛЕЗ *RAPANA VENOSA*

Реферат

Цель. Исследование биохимических и физико-химических свойств карбоксилэстераз гомогенатов пищеводной железы и гепатопанкреаса моллюска *Rapana venosa*, изучение особенностей энантиоселективного ферментативного гидролиза сложного эфира 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она, потенциального анксиолитического и снотворного средства. **Методы.** Пищеварительные железы *Rapana venosa* гомогенизировали для дальнейших исследований и определяли содержание белка по методу Лоури-Хартри, эстеразную активность по 1- и 2- нафтилацетатам. Ферментативный гидролиз сложного эфира 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она, проводили в течение 2,5 ч в растворе диметилсульфоксид: Na-фосфатный буфер, 0,0167 М, pH 7,0, в объемных соотношениях 2:3, при температуре 37 °C. Определение энантиомерного избытка осуществляли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, используя систему SHIMADZU, оснащенную колонкой ChiraDex HR 5µm (4mm × 250mm). **Результаты.** Впер-



вые показано, что эстеразная активность гомогенатов гепатопанкреаса и пищеводной железы по 2-нафтилацетату, в качестве субстрата, в 3,6 раза и в 6,7 раза больше, чем по 1-нафтилацетату, соответственно. Принадлежность эстераз в гомогенатах к семейству карбоксилэстераз подтверждена полным подавлением их активности селективным ингибитором карбоксилэстераз ди-(*p*-нитрофенил)фосфатом (2,0 ммоль/дм³). Показано, что рН-оптимумы эстеразной активности гомогенатов пищеводной железы и гепатопанкреаса составляют 7,5, и 5,5, соответственно. Изучены особенности гидролиза сложного эфира 3-гидрокси-1,4-бензодиазепин-2-она, катализируемого карбоксилэстеразами в составе гомогенатов пищеварительных желез *Rapana venosa*. Показано преимущественное образование *R*-энантиомера субстрата (энантиомерный избыток *R*-энантиомера составил 42 %). **Выводы.** Выявлена региоселективность относительно 1-, 2-нафтилацетатов и энантиоселективность карбоксилэстераз сложного эфира 3-гидрокси-1,4-бензодиазепин-2-она.

Ключевые слова: карбоксилэстераза, пищеварительные железы *Rapana venosa*, региоселективность, энантиоселективность.

**I. I. Romanovska¹, O. V. Sevastyanov¹, Ye. A. Shesterenko¹,
A. A. Krysko¹, Yu. A. Shesterenko¹, V. A. Toptikov²**

¹ A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute, National Academy of Sciences of Ukraine,
86, Lustdorfska road, Odesa, Ukraine, tel.: +38 (048)765 94 31,
e-mail: romairina@gmail.com

² Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska St., Odesa, 65082, Ukraine

CARBOXYLESTERASES OF *RAPANA VENOSA* DIGESTIVE GLANDS HOMOGENATES

Summary

Aim. Investigation of biochemical and physico-chemical properties of carboxylesterases in homogenates gland and hepatopancreas of *Rapana venosa*; study of the features of enantioselective enzymatic hydrolysis of 3-hydroxy-1,4-benzodiazepine-2-one ester, potential anxiolytic and hypnotic drug. **Methods.** Digestive glands of *Rapana venosa* were homogenized for subsequent investigations, the protein content in them was determined by the Lowry-Hartree method and esterase activity – according to 1-, 2-naphthyl acetates. Enzymatic hydrolysis of 3-hydroxy-5-phenyl-7-bromo-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-one was conducted for 2,5 h in the solution: dimethyl sulfoxide: Na-phosphate buffer 0,0167 M, pH 7,0 in volume ratio 2:3, at 37 °C. Determination of enantiomeric excess was conducted with help of high performance liquid chromatography in SHIMATSU system, equipped with ChiraDex HR 5μm(4mm×250mm) column. **Results.** For the first time it was shown, that esterase activity of hepatopancreas and esophageal gland homogenates for 2-naphthyl acetate as substrate, was 3,6-fold and 6,7-fold greater, than for 1-naphthyl acetate, respectively. The belonging of esterases in homogenates to the family of carboxylesterase was confirmed by the total suppression of their activity by the selective carboxylesterase inhibitor; di-(*p*-nitrophenyl)phosphate (2.0 mmol/dm³). It was shown, that pH-optima of esterase activity in homogenates of esophageal gland and hepatopancreas equals 7,5 and 5,5, respectively. The features of 3-hydroxy-1,4-benzodiazepine-



2-one ester hydrolysis, catalyzed by carboxylesterase of *Rapana venosa* digestive glands homogenates were studied. The preferential formation of the R-enantiomer of substrate was shown (enantiomeric excess of R- enantiomer was 42%).

Conclusion. The regioselectivity of carboxylesterase to 1-, 2-naphtyl acetates and enantioselectivity of 3-hydroxy-1,4-benzodiazepine-2-one ester were found.

Key words: carboxylesterase, digestive glands of *Rapana venosa*, regioselectivity, enantioselectivity.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Топтіков В. А., Ковтун О. О., Алексєєва Т. Г. Морфологія та фізіологія червоногого молюска *Rapana venosa*. Навчально-методичний посібник. – Одеса: Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2014. – 68 с.
2. Ланач С. Н., Чубенко А. В., Бабиш П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион, 2000. – 320 с.
3. Шестеренко Е. А., Романовская И. И., Севастьянов О. В., Андронати С.А. Карбоксилэстеразы в энантиоселективном синтезе органических соединений // *Biotechnologia Acta*. – 2013. – Т. 6, № 1. – С. 9–21.
4. Calcaterra A., D'Acquarica I. The market of chiral drugs: Chiral switches versus de novo enantiomerically pure compounds // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2018. – V. 147. – P. 323–340.
5. Douhri H., Sayah F. The use of enzymatic biomarkers in two marine invertebrates *Nereis diversicolor* and *Patella vulgata* for the biomonitoring of Tangier's bay (Morocco) // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2009. – V. 72, № 2. – P. 394–399.
6. Browne M. A., Dissanayake A., Galloway T. S. Organophosphorous biocides reduce tenacity and cellular viability but not esterase activities in a non-target prosobranch (limpet) // *Env. Pollution*. – 2015. – V. 203, № 4. – P. 208–213.
7. Hartree E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // *Anal. Biochem.* – 1972. – V. 48, № 1. – P. 422–427.
8. Hosokawa M. Structure and catalytic properties of carboxylesterase isozymes involved in metabolic activation of prodrugs // *Molecules*. – 2008. – V. 13, № 2. – P. 412–431.
9. MacKenzie L. A., Selwood A. I., Marshall C. Isolation and characterization of an enzyme from the Greenshell™ mussel *Perna canaliculus* that hydrolyses pectenotoxins and esters of okadaic acid // *Toxicon*. – 2012. – V. 60, № 3. – P. 406–419.
10. Mohie M. K., E. D. Sharaf, A. M. Khalid, et al. Colorimetric determination of simvastatin and lovastatin in pure form and in pharmaceutical formulations // *Spectrochim. Acta, Part A*. – 2010. – V. 76. – P. 406–419.
11. Mozayani A., Raymon L. P. Handbook of Drug Interactions. A clinical and forensic guide. – New York, Totowa: Humana Press Inc, 2004. – 663 p.
12. Patel R. N. Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals // *Bioorg. Med. Chem.* – 2018. – V. 26, № 7. – P. 252–1274.



13. Reguera P., Couceiro L., Fernandez N. A review of the empirical literature on the use of limpets *Patella* spp. (Mollusca: Gastropoda) as bioindicators of environmental quality // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* –2018. – V. 48, № 2. – P. 593–600.
14. Shesterenko Ye. A., Romanovska I. I., Sevastyanov O. V., Andronati S. A., Pavlovsky V. I., Yurpalova T. A., Wicher B., Kravtsov V. Ch., Krysko A. A. Enantioselective hydrolysis of 3-hydroxy-1,4-benzodiazepin-2-one esters by pig liver microsomes // *J. Mol. Catal. B. Enzym.* – 2014. – V. 102. – P. 27–33.
15. Toptikov V. A., Totsky V. N., Aleksieieva T. G., Kovtun O. A. Hydrolytic enzymes expressivity in different parts of the *Rapana* digestive system // *Ukr. Biochem. J.* – 2016, V. 88, № 3. – P. 5–17.
16. Toptikov V. A., Alekseyeva T. G., Kovtun O. O. Hydrolytic enzymes in *Rapana venosa* digestive system. – Saarbrücken: LAP LAMBERT Academi Publishing, 2017. – 65 p.
17. Yang K., Lu X. Racemization kinetics of enantiomeric oxazepam: stereoselective hydrolysis of enantiomeric oxazepam 3-acetate in rat liver microsomes and brain homogenate // *J. Pharm. Sci.* – 1989. – V. 78, № 10. – P. 789–795.

Referens

1. Toptikov VA, Kovtun OO, Alexeeva TG. Morfolohiia ta fiziolohiia cherevonohoho molyuska *Rapana venosa*. Navchalno-metodychnyi posibnyk. – Odesa: Odeskyi natsionalnyi universytet imeni I.I. Mechnykova, 2014, 68 p.
2. Lapach SN, Chubenko AV, Babich PN. Statisticheskiye metody v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s ispolzovaniyem Excel. – K.: Morion, 2000. – 320 p.
3. Shesterenko EA, Romanovskaya II, Sevastyanov OV, Andronati SA. Karboksilesterazy v enantiosektivnom sinteze organicheskikh soyedineniy. *Biotechnologia Acta*. 2013;6(1):9-21.
4. Calcaterra A, D'Acquarica I. The market of chiral drugs: Chiral switches versus de novo enantiomerically pure compounds. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018;147:323-340.
5. Douhri H, Sayah F. The use of enzymatic biomarkers in two marine invertebrates *Nereis diversicolor* and *Patella vulgata* for the biomonitoring of Tangier's bay (Morocco). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2009;72(2):P. 394-399.
6. Browne MA, Dissanayake A, Galloway TS. Organophosphorous biocides reduce tenacity and cellular viability but not esterase activities in a non-target prosobranch (limpet). *Env. Pollution*. 2015;203(4):P. 208-213.
7. Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 1972;48(1):P. 422-427.
8. Hosokawa M. Structure and catalytic properties of carboxylesterase isozymes involved in metabolic activation of prodrugs. *Molecules*. 2008;13(2):412–431.
9. MacKenzie LA, Selwood AI, Marshall C. Isolation and characterization of an enzyme from the Greenshell™ mussel *Perna canaliculus* that hydrolyses pectenotoxins and esters of okadaic acid. *Toxicon*. 2012;60(3):406-419.



10. Mohie MK, Sharaf ED, Khalid AM et al. Colorimetric determination of simvastatin and lovastatin in pure form and in pharmaceutical formulations. *Spectrochim. Acta, Part A*. 2010;76:406-419.

11. Mozayani A, Raymon LP. *Handbook of Drug Interactions. A clinical and forensic guide*. New York, Totowa: Humana Press Inc, 2004, 663 p.

12. Patel RN. Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals. *Bioorg. Med. Chem.* 2018;26(7):1252-1274.

13. Reguera P, Couceiro L, Fernandez N. A review of the empirical literature on the use of limpets *Patella* spp. (Mollusca: Gastropoda) as bioindicators of environmental quality. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2018;48(2):593-600.

14. Shesterenko YeA, Romanovska II, Sevastyanov OV, Andronati SA, Pavlovsky VI, Yurpalova TA, Wicher B, Kravtsov VCh, Krysko AA. Enantioselective hydrolysis of 3-hydroxy-1,4-benzodiazepin-2-one esters by pig liver microsomes. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 2014;102:P. 27-33.

15. Toptikov VA, Totsky VN, Aleksieieva TG, Kovtun OA. Hydrolytic enzymes expressivity in different parts of the *Rapana* digestive system. *Ukr. Biochem. J.* 2016;88(3):5-17.

16. Toptikov VA, Alekseyeva TG, Kovtun OO. *Hydrolytic enzymes in Rapana venosa digestive system*. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academi Publishing, 2017. 65 p.

17. Yang K, Lu X. Racemization kinetics of enantiomeric oxazepam: stereoselective hydrolysis of enantiomeric oxazepam 3-acetate in rat liver microsomes and brain homogenate. *J. Pharm. Sci.* 1989;78(10):789-795.

Стаття надійшла до редакції 03.05.2018 р.

