

АГЛЯДЫ

REVIEWS

УДК 577.152.3

Поступила в редакцию 24.01.2017

Received 24.01.2017

Н. М. Литвинко

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь***ПРИКЛАДНАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ ФОСФАТИДАЦИЛГИДРОЛАЗ
В ИЗУЧЕНИИ ВЗАИМОСВЯЗИ «СТРУКТУРА – ФУНКЦИЯ»
В РЯДУ БИОПОЛИМЕРОВ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ**

Аннотация: Представлен обзор основных экспериментальных результатов в области прикладной энзимологии фосфатидацилгидролаз при исследовании взаимосвязи «структура – функция» в процессе фосфолипидизации с участием растворимых (гемоглобин), периферических (цитохром b_5), интегральных (CYP2B4) и якорных (CYP3A4) белков, а также низкомолекулярных биорегуляторов (хлор- и фосфорорганические соединения, производные 1,3-циклогександиона, оксазола, тиотетроновых и жирных кислот). Обсуждены стратегические перспективы развития научных исследований и инновационных технологий в рамках биоорганической химии по направлению прикладная (инженерная) энзимология с участием фосфолипидных ферментов.

Ключевые слова: фосфолипаза A_2 и фосфолипаза C, фосфолипидизация, физиологически активные соединения

Для цитирования: Литвинко, Н. М. Прикладная энзимология фосфатидацилгидролаз в изучении взаимосвязи «структура–функция» в ряду биополимеров и низкомолекулярных биорегуляторов / Н. М. Литвинко // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 3. – С. 115–128.

N. M. Litvinko

*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus***APPLIED ENZYMOLOGY OF PHOSPHATIDACYLHYDROLASES IN A STUDY
OF THE STRUCTURE–FUNCTION RELATIONSHIP IN THE SERIES OF BIOPOLYMERS
AND LOW-MOLECULAR BIOREGULATORS**

Abstract: Overview of the main experimental results in the field of applied enzymology of phosphatidacylhydrolases in a study of the structure – function relationship in the process of a phospholipolysis including soluble (hemoglobin), peripheral (b_5), integral (CYP2B4) and anchor (CYP3A4) proteins, as well as low-molecular bioregulators (chlorine- and phosphoorganic compounds, derivatives of 1,3-cyclohexanedione, oxazole, the tiotetronic and fatty acids). The strategic prospects of development of scientific research and innovation within bioorganic chemistry at the field of applied (engineering) enzymology involving phospholipolytic enzymes, are discussed.

Keywords: phospholipase A_2 and phospholipase C, phospholipolysis, physiologically active compounds

For citation: Litvinko N. M. Applied enzymology of phosphatidacylhydrolases in a study of the structure–function relationship in the series of biopolymers and low-molecular bioregulators. *Vestsi Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk*. [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 3, pp. 115–128 (In Russian).

Введение. Использование биокатализа в химии – типичный пример «зеленой химии», под которой подразумевают любое усовершенствование химических процессов, которое положительно влияет на окружающую среду.

В настоящее время продукты прикладной (инженерной) энзимологии определяют состояние крупнейших отраслей, таких как фарминдустрия, пищевая, целлюлозно-бумажная, текстильная промышленности и многие другие сектора экономики с миллиардными оборотами, во многом за-

висят от прогресса в области новых биотехнологий на основе ферментов. Ферменты по объему производства занимают 3-е место в мире после аминокислот и антибиотиков. В нашей стране экспорт ферментов составляет 5% от его общего объема. Это направление весьма актуально, поскольку лекарственная и продовольственная безопасность, борьба с террористической угрозой, экологическая и демографическая обстановка в стране, усиление экономического потенциала – все это напрямую связано и обусловлено состоянием дел в отечественной биотехнологии, в том числе и инженерной энзимологии.

Основная часть. Как новая отрасль науки, инженерная энзимология начиналась в 70-х годах прошлого столетия с промышленной энзимологии, являющейся, по сути, основой биотехнологии, с использования в промышленном масштабе иммобилизации ферментов. Как известно, фермент, ковалентно присоединенный («пришитый») к любому органическому или неорганическому полимерному носителю (матрице) называют иммобилизованным [1]. Техника иммобилизации ферментов допускает решение ряда ключевых вопросов энзимологии (рис. 1): обеспечение высокой специфичности действия ферментов и повышения их стабильности, простоту в обращении, возможность повторного использования, применение их в синтетических реакциях в потоке [2]. Применение подобной техники в приложении к промышленности получило название инженерной энзимологии (табл. 1)

Таблица 1. Иммобилизованные ферменты, используемые в промышленности [4]

Table 1. Immobilized enzymes used in industry [4]

Иммобилизованный фермент	Объемы выпуска, т/г	Получаемый продукт	Страна
Аминоацилаза	< 5	L-аминокислоты	Япония
Аминоглюкозидаза	1	Глюкоза	Англия
Глюкозоизомераза	1500–1750	Глюкозо-фруктозные сиропы	Дания, Нидерланды, Япония
Гидантоиназа	< 1	D-фенилглицин	Япония
Лактаза	5	Лактозные гидролизаты	Япония
Нитрилаза	0,1	Акриламид	Япония
Пенициллин G-ацилаза	3–4	6 АПК	Япония, Нидерланды
Пенициллин V-ацилаза	1	6 АПК	Англия, Австрия

С использованием биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов в исследованиях в области сэндвичевых соединений, положивших основу для изобретения биокатализаторов, улучшающих свойства низкокачественных бензинов, была Джеффри Уилкинсоном и Эрнстом Фишером разработана технология с применением биокатализатора MPG – Нобелевского лауреата 1973 года [3], которая позволяет увеличить пройденное автомобилем расстояние на том же количестве топлива, при этом повышается КПД двигателя (рис. 2).

За прошедшие 4,5 десятилетия ареал исследований в области инженерной энзимологии значительно расширился. Современная инженерная энзимология – это перспективное научно-техническое направление, которое объединяет фундаментальные и прикладные научные исследования по достаточно широкому спектру работ, охватывающему изучение структурно-функциональных особенностей биокатализа [5, 6], выделение ферментов из биологических объектов; иммобилизацию, в том числе включение в мицеллы, и их влияние на ферментативную активность [7, 8]; липосомы и их использование [9]; ферменты в экстремальных условиях; конструирование биокатализаторов и их использование в биотехнологии [10]; использование ферментов в тонком химическом синтезе; медицинская энзимология (энзимодиагностика, энзимотерапия) [11, 12]; иммуноферментный анализ – основные принципы, виды и их отличительные характеристики [13]; утилизация промышленных отходов с помощью ферментов; создание биоэлектрохимических преобразователей энергии с использованием ферментов; индустриальный биокатализ; получение биотоплив и др.

Анализ результатов деятельности Института биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси показывает, что работы его сотрудников в области инженерной энзимологии

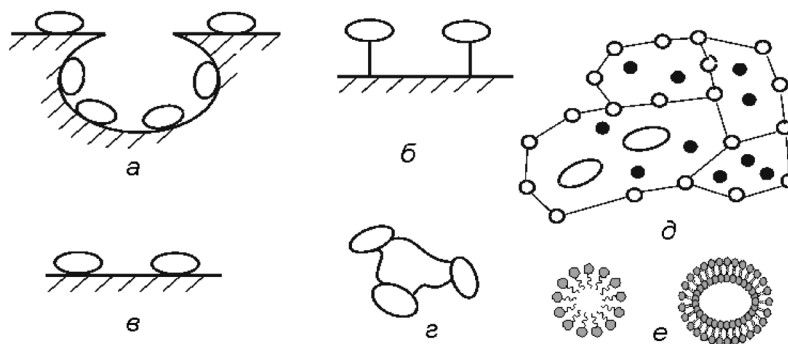


Рис. 1. Основные методы иммобилизации ферментов: *a* – абсорбция на крупнопористом носителе; *b* – ковалентное связывание; *c* – адсорбция; *d* – поперечная сшивка; *e* – включение в гель; *e* – включение в мицеллы и липосомы

Fig. 1. Main methods of enzyme immobilization: *a* – absorption on a coarse-pore carrier; *b* – covalent bonding; *c* – adsorption; *d* – cross-linking; *e* – incorporation in gel; *e* – incorporation in micelles and liposomes

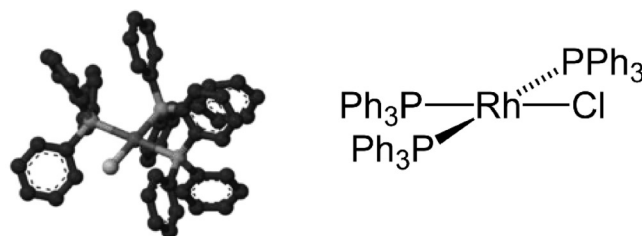


Рис. 2. Катализатор Уилкинсона [3]

Fig. 2. Wilkinson catalyst [3]

являются определяющими для становления биоорганической химии (рис. 3). Каждая лаборатория внесла определенный вклад в развитие соответствующего направления инженерной энзимологии:

1) выделение ферментов в высокочистом состоянии, например, цитохром P450, фосфолипаза A₂ (ФЛА₂), фосфолипаза C (ФИ-ФЛС), тиропероксидаза (ТПО), цитохром b₅ [14–16];

2) иммобилизация – адсорбционная, ковалентная, в агарозном геле, включение в липосомы и обращенные мицеллы, жидко- и твердофазная (ФЛА₂, пероксидаза, каталаза, уреазы и др.) [17];

3) структурно-функциональные особенности биокатализа, определение первичной и пространственной структуры (ЦР450), механизмов действия (ЦР450, ФЛА₂, пероксидаза, ТПО и др.) [18–21];

4) иммунохимия, иммуноферментный микроанализ. Маркеры антигенов и антител в ИФА (пероксидаза хрена, каталаза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, конъюгаты ферментов с антигенами и антителами против них, ТПО) [22–24];

5) ферменты, используемые в тонком органическом синтезе: нуклеозидов (ДНК и РНК-полимеразы, нуклеозидкиназы и др.) [25], липидов (ФЛА₂, ФЛД);

6) липосомы – как контейнеры для лекарств (например, инсулина, конъюгаты с противоопухолевыми нуклеозидами), стабильность к ферментной деградации липосом и протеолипосом (ФЛА₂) [26, 27];

7) иммунотоксины (барназа) – для энзимодиагностики, энзимотерапии медицинской энзимологии [28–30];

8) белковая инженерия для целенаправленного множественного практического использования – рекомбинантные белки семейства ЦР450, ТПО [31].

Нами в результате комплексного исследования фосфолиполиза с участием растворимых (гемоглобин), периферических (цитохром b₅), интегральных (СУР2В4) и якорных (цитохром С и СУР3А4) белков, а также низкомолекулярных биорегуляторов (хлор- и фосфорорганические соединения, производные 1,3-циклогександиона, оксазола, тиотетраоновых и жирных кислот) нако-

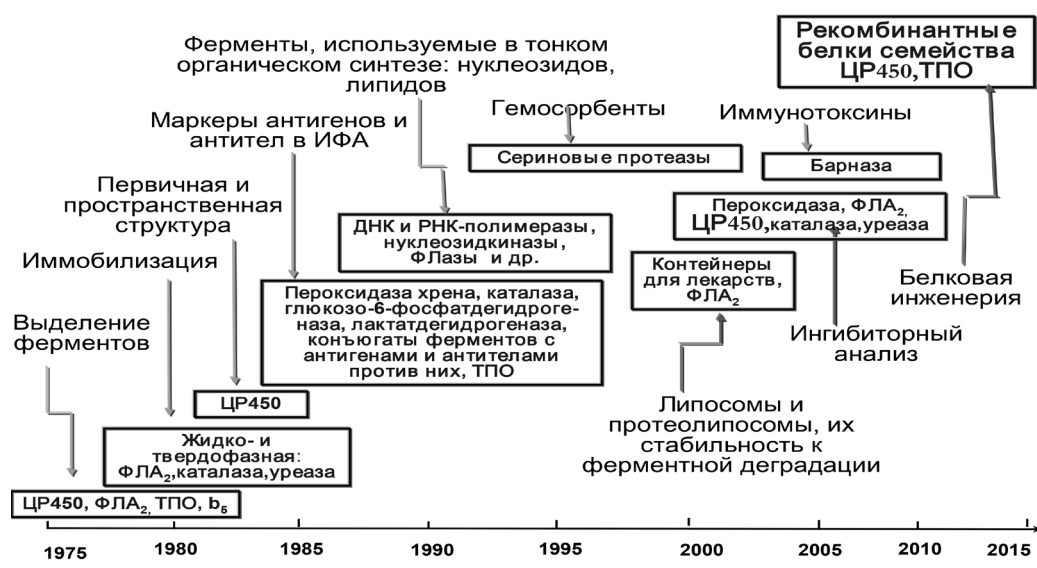


Рис. 3. Этапы становления инженерной энзимологии в Институте биоорганической химии НАН Беларуси

Fig. 3. Stages of the formation of engineering enzymology at the Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus

плен определенный опыт в решении проблем ряда разделов инженерной энзимологии фосфатидилгидролаз (ФЛА₂, ФЛС, ФЛД):

- изучены физико-химические свойства 10 катализаторов фосфолиполиза (6 разных ФЛА₂ – ядов трех змей и пчелы, панкреаса свиньи, человека; 3 микробных ФЛС и 1 ФЛД из капусты) в ряду природных и полусинтетических фосфолипидов: фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилэтанола, фосфатидилсерина, фосфатидилинозита, кардиолипина как в индивидуальном состоянии, так и в различных сочетаниях, в том числе в смеси со сфингомиелином, негидролизуемым этими ферментами [32];

- выделены в высокоочищенном состоянии ФЛА₂ панкреаса свиньи [33, 34];

- проведен теоретический анализ первичных структур разных функциональных видов фосфолипаз А₂ [35];

- уточнена топография активного центра ФЛА₂ и ФЛС [36, 37];

- впервые получены антитела к ФЛА-зам (ФЛА₂ – ядов гадюки, гюрзы и кобры, панкреаса свиньи, пчелы, ФЛС *Clostridium perfringens*) и протеиназам (трипсина и химотрипсина) и охарактеризованы иммунохимические свойства поверхности глобулы этих белков [38];

- выявлены основные свойства межфазной поверхности, играющие определяющую роль в катализе фосфолиполитических реакций: заряд > супрамолекулярная организация > структурная упорядоченность фосфолипидов в мембране > химическое строение [32];

- проведен на кинетическом уровне поиск ингибиторов и активаторов ФЛА₂ кобры и панкреаса свиньи [39];

- установлена *in vitro* прямая и опосредованная взаимосвязь фосфолиполиза с функционированием двух изоферментов монооксигеназного катализа (СУР2В4 и СУР3А4) [40];

- охарактеризована стабильность липосом и протеолипосом с включением якорных и периферических белков к ферментной деградации [32] (рис. 4) и др.

Нами разработан новый системный подход к изучению стабильности ФЛА₂ и ФЛС по отношению к разным фосфолипидам (цвиттер-ионным, анионным) с использованием в комплексе в одинаковых условиях целенаправленно модифицированных модельных липидных мембран (по заряду, супрамолекулярной организации, структурной упорядоченности, физическому состоянию, по составу с включением интегральных, «якорных», периферических белков), при воздействии внутренних (этанол, лизоллипиды, жирные кислоты и их амиды, нуклеозиды и их производные, в том числе конъюгаты с ФЭ) и внешних (радиационное воздействие, УФ-облучение, пестициды) факторов [32] (рис. 4).

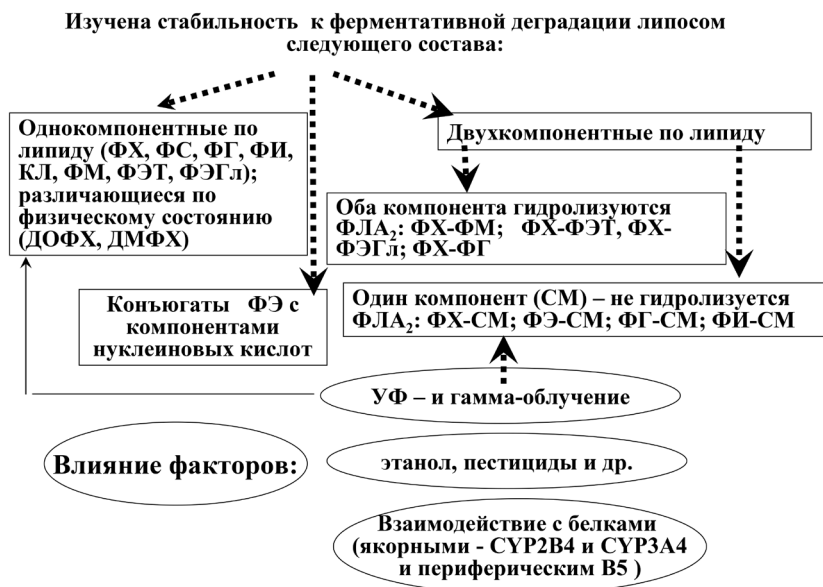


Рис. 4. Схема системного подхода исследования стабильности к ферментативной деградации липосом как потенциальных контейнеров лекарств различного фосфолипидного состава – фосфатидил: -холин (ФХ), -серин (ФС), -глицерин (ФГ), -инозит (ФИ), -метанол (ФМ), -этанол (ФЭТ), -этанолламин (ФЭ), -этиленгликоль (ФЭГл), диолеоилфосфатидилхолин (ДОФХ), димиристоилфосфатидилхолин (ДМФХ), кардиолипин (Кл), сфингомиелин (СМ)

Fig. 4. Scheme of the systematic approach to the research of stability to enzymatic degradation of liposomes with different phospholipid composition, as a potential drug carriers – phosphatidyl: -choline (ФХ), -serine (ФС), -glycerol (ФГ), -inositol, methanol (ФМ), -ethanol (ФЭТ), -ethanolamine (ФЭ), -ethylene glycol (ФЭГл), dioleoylphosphatidylcholine (ДОФХ), dimyristoylphosphatidylcholine (ДМФХ), cardiolipin (Кл), sphingomyelin (СМ)

При изучении устойчивости к действию ФЛА₂ глицерофосфолипидов в составе одно- и двухкомпонентных липосом обнаружен стимулирующий деградацию цвиттер-ионного ФХ эффект анионных фосфолипидов ФМ, ФЭТ, ФЭГл в двухкомпонентных липосомах (соотношение 1:3 моль/моль). Усиленный гидролиз цвиттер-ионного ФХ в зависимости от доли ФЭТ наблюдается в пределах содержания последнего в смеси от 40 до 80 мол.%. Изменения гидролиза ФЭТ незначительны.

Поскольку этанол нарушает упорядоченность липидного бислоя, в его присутствии скорость гидролиза ДОФХ в двухкомпонентных липосомах по сравнению со скоростью его гидролиза в однокомпонентных в отсутствие спирта возрастает в 2–3,5 раза в зависимости от концентрации этанола. Наиболее устойчивыми к ферментативному разрушению оказались фосфолипиды в составе двухкомпонентных липосом со сфингомиелином. По скорости ферментативного расщепления наблюдается следующий ряд: ФИ = ФЭ > ФХ > ФГ. Степень гидролиза ДОФХ снижалась в начальный период реакции (до 10 мин) практически вдвое в эквимольной смеси с ДОФГ.

Результаты исследования межфазного катализа липолитических реакций с использованием фосфолипаз привели к важнейшим фундаментальным выводам:

наличие в молекуле фермента ранее необнаруженного анионного участка (сайта) для взаимодействия фермента с межфазной поверхностью [41]; участие цитидинсодержащих нуклеозидов в фосфолиполизе [42]; механизм действия фосфолипаз по типу «сериновых катализаторов» и их общий с протеазами эволюционный предшественник [35]; первичная регуляция каталитической способности фосфолипаз на надмолекулярном уровне зависит в большей степени от супрамолекулярной организации межфазной поверхности, ее структурной упорядоченности и заряда при второстепенной роли химического строения субстрата [43]; утрата абсолютной специфичности ФИ-ФЛС при изменении заряда межфазной поверхности [44]; изменение поверхностной специфичности фермента поджелудочной железы и приобретение несвойственной ему способности разрушать целостные клеточные мембраны в присутствии некоторых 1,3-циклогександионов [45] и др.

Проведенные исследования привели к разработке комплекса оригинальных методов выделения фосфолипазы А₂ из биологического материала путем жидкофазной аффинной сорбции с применением обращенных мицелл лецитина в толуоле [46]; определения активности фосфоли-

пазы A_2 с использованием ТСХ для разделения продуктов гидролиза [47] и технологии разностной спектрофотометрии [48]; определения общей антиоксидантной способности биологической жидкости с использованием липидной фазы [49]; определения общей антиоксидантной активности сыворотки крови [50] и других нетривиальных приемов и способов.

Установлены различные механизмы катализа (прямой, опосредованной и обратной связи) в присутствии ряда низкомолекулярных биорегуляторов: лизолипидов, жирных кислот и их амидов, производных простагландинов, циклогександионов с пестицидной активностью, производных нуклеозидов с противоопухолевой и противовирусной активностью [51]. Обнаружены неизвестные ранее ингибиторы фосфолипидизации среди физиологически активных соединений: амидов жирных кислот, 9-*Me*, 10-*Me*, 11-*Me* аналогов простагландинов, производных тиотетрановой кислоты, производных оксазола, 1,3-циклогександионов, фосфодиэфирных производных ацикловира и аденозина (табл. 2). Из табл. 2 следует, что исследованные низкомолекулярные биорегуляторы, оказавшие наибольший эффект на функцию фосфатаццилгидролазы, имеют в своей структуре циклический фрагмент.

Таблица 2. Основные ксенобиотики, оказавшие наибольший эффект при изучении ФЛА₂

Table 2. Basic xenobiotics with the greatest influence on the study of PLA₂

№ п/п	Соединение	Эффект
<i>I. Хлорорганические арилсодержащие соединения</i>		
1	Пропиканозол, 1-[2-(2,4-дихлорфенил)-[1,3]диоксолан-2-илметил]-1Н-[1,2,4]-триазол	$1-S/S_0$, $-0,076 \pm 0,01$
2	Циперметрин, (R,S)- α -циано-3-феноксibenзил (IRS)-цис-транс-3-(2,2-дихлорвинил)-2,2-диметилциклопропанкарбоксилат	$1-S/S_0$, $-0,022 \pm 0,01$
3	Хизалофоп-П-этил, (R)-2-[4-(6-хлорхиноксалин-2-изокси)фенокси]пропионовый кислоты этиловый эфир	$IC_{50} = 0,013$ мМ
<i>II. Фосфорорганические соединения</i>		
4	Глифосат, N(фосфонометил)-глицин	тип ингибирования – конкурентный: увеличение K_m ; снижение K_s , $V_{max} = V_{maxi}$ $K_i = 23,5$ мМ, $IC_{50} = 3$ мМ
5	Фосфорной кислоты 2-(2-амино-6-оксо-3,6-дигидро-пурин-9-илметокси)-этиловый эфир 2-(4-нитрофенил)-этиловый эфир, фосфодиэфирное производное ацикловира	S/S_0 , ЛК, ингибирование 38 ± 5 %; М, ФХ: ДХ- <i>Na</i> , тип ингибирования конкурентный: увеличение K_m ; снижение K_s , $V_{max} = V_{maxi}$, $K_i = 0,15$ мМ $IC_{50} = 100$ мкМ
6	Бензойной кислоты 5-(6-бензоиламинопури-9-ил)-4-{гидрокси-[2-(4-нитрофенил)этокси]-фосфорилокси}-2-[(2-метоксифенил)-дифенилметоксиметил]-тетрагидрофуран-3-ил-этиловый эфир	S/S_0 , ЛК, ингибирование 36 ± 5 % М, ФХ: ДХ- <i>Na</i> , тип ингибирования конкурентный: увеличение K_m ; снижение K_s , $V_{max} = V_{maxi}$, $K_i = 0,1$ мМ, $IC_{50} = 50$ мкМ;
7	Ацикловирмонофосфат	S/S_0 , ЛК – активирование 15 %, М, ФХ: ДОХ, активирование в 1,1 раза
8	Ацикловиртрифосфат	S/S_0 , ЛК – активирование 38 % М, ФХ: ДОХ, активирование в 1,15 раза
9	Аденозин монофосфат	S/S_0 , ЛК – активирование 5 % М, ФХ: ДОХ ингибирование 40 % (50 мкМ), активация 15 % (0,5 мкМ) Л – не влияет
10	Аденозиндифосфат	S/S_0 , ЛК – активирование 5 % М, ФХ: ДОХ, ингибирование 30 % (50 мкМ), не влияет (0,5 мкМ) Л – ингибирование до 40 %
11	Аденозинтрифосфат	S/S_0 , ЛК – активирование 15 %; М, ФХ: ДОХ, ингибирование 40 % (50 мкМ), активация 20 % (0,5 мкМ) Л – не влияет

Продолжение табл. 2

№ п/п	Соединение	Эффект
12	Циклический аденозинмонофосфат, переносчик гормонального сигнала внутрь клетки	S/S_0 , ЛК – активирование в 1,3 раза, М, ФХ:ДОХ, ингибирование (50 мкМ) 80 % (2 мин) далее не влияет; Л – ингибирование 40 %
13	Гуанозинмонофосфат	S/S_0 , ЛК – активирование на 15 %
14	Цитозинмонофосфат	S/S_0 , ЛК – активирование в 1,7 Л – ингибирование 80 % (до 2 мин)
15	Фосфолипидное производное ацикловира	Л – скорость гидролиза снижена в 3 раза по сравнению с ФЭА
<i>III. Производные 1,3-циклогександиона</i>		
16	2-пропионил-5-(2,4,6-триметил-фенил)-циклогексан-1,3-дион	ЛК, $1-S/S_0$, $0,38 \pm 0,01$; М, тип ингибирования – сопрягающий (бесконкурентный): $V_{\max} > V_{\max i}$, снижение K_m , увеличение K_S , $K_i = 5,3$ мМ
17	Тралкоксидим, 2-(1-этоксиимино-пропил)-5-(2,4,6-триметил-фенил)-циклогексан-1,3-дион	$1-S/S_0$, $0,21 \pm 0,02$; М, тип ингибирования – сопрягающий (бесконкурентный): $V_{\max} > V_{\max i}$, снижение K_m , увеличение K_S , $K_i = 6,25$ мМ
18	2-(цис,цис-9,12-октадекадиеноил)-циклогексан-1,3-дион	ЛК, $1-S/S_0$, $0,323 \pm 0,02$ М, тип ингибирования – сопрягающий (бесконкурентный): $V_{\max} > V_{\max i}$, снижение K_m , увеличение K_S , $K_i = 4$ мМ
<i>IV. Производные оксазола</i>		
19	19. 6-(2-(этилтио)пропил)-2-пропил-6,7-дигидро-1,3-бензоксазол-4(5H)-он	ЛК, $1-S/S_0$, $-0,061 \pm 0,02$
20	2-этил-6-(2,4,6-триметил-фенил)-6,7-дигидро-5Н-бензоксозол-4-он О-этилоксим	ЛК, $1-S/S_0$, $0,28 \pm 0,01$
21	2-этил-6-(2,4,6-триметил-фенил)-6,7-дигидро-5Н-бензоксозол-4-он	ЛК, $1-S/S_0$, $0,30 \pm 0,01$
<i>V. Производные тиотетрановых кислот</i>		
22	5-[(Z)-фенилметилен]-3-[(E)-3-фенил-2-пропеноил]-2,4-(3H,5H)тиофендион	ЛК, S/S_0 , (%): $75,7 \pm 5,0$ – ФЛА _п ; $102,9 \pm 6,4$ – ФЛА _з ; М: ФХ с тритоном Х-100, скорость реакции снижена на 2,7 %, М: ФХ с ДОХ, скорость реакции снижена на 79,9 %; тип ингибирования ФЛА _п – конкурентный: увеличение K_m ; снижение K_S , $V_{\max} = V_{\max i}$
23	5-бензил-3-[(3-фенил)пропаноил]-2,4-(3H,5H)-тиофендион	ЛК, S/S_0 , (%): $85,0 \pm 2,0$ ФЛА _п ; $145,0 \pm 7,0$ ФЛА _з М: ФХ с тритоном Х-100, скорость реакции снижена на 7,3 %; М: ФХ с ДОХ, скорость реакции снижена на 50 %
24	5-[(E)-2-фурилметилен]-3-[(E)-3-(2-фурил)-2-пропеноил]-2,4-(3H,5H)-тиофендион	ЛК, S/S_0 , (%): $97,2 \pm 2,4$ ФЛА _п ; $102,9 \pm 6,4$ – ФЛА _з ; М: ФХ с ДОХ, скорость реакции снижена на 1,6 %, тип ингибирования – конкурентный: $V_{\max} = V_{\max i}$ совпадают, увеличение K_m , снижение K_S
25	...6-{[1-(5-бензил-2,4-диоксотетрагидро-3-тиофенилен)-3-(3-хлорофенил)пропил]амино} гексановая кислота	ЛК, S/S_0 , (%): $82,0 \pm 2,4$ ФЛА _п ; $94,0 \pm 4,5$ ФЛА _з М: ФХ с тритоном Х-100, скорость реакции снижена на 14 %, М: ФХ с ДОХ, скорость реакции снижена на 10 %

Примечания: форма супрамолекулярной организации субстрата (фосфатидилхолин, ФХ): ЛК – липопотеиновый комплекс яичного желтка; М – смешанные мицеллы с тритоном Х-100 или дезоксихолатом натрия, ДОХ; Л – липосомы.

S/S_0 – отношение площади зоны просветления вокруг места нанесения фермента при его диффузии в агарозном геле, содержащем ЛК, в присутствии эффектора и без него.

В 70-х годах прошлого столетия в области изучения фосфолиполиза был известен только класс секреторных фосфолипаз, выделяемых железами внутренней или внешней секреции – панкреаса млекопитающих, ядовитых желез змей, пчел (ФЛА₂), деятельности микроорганизмов (ФЛС), растительных клеток ФЛД. Последующее развитие исследований химии фосфолипаз показало важнейшую роль этих ферментов в регуляции биохимических процессов в клетке: от участия в клеточном ответе на стимул при активации любой сигнальной молекулой рецептора G-белка и открывание кальциевых каналов через продукты фосфолиполиза до апоптоза путем действия фактора некроза опухоли на соответствующий рецептор и последующей передачи посредством продуктов липолитических реакций, являющихся вторичными мессенджерами [35].

Сейчас открыты 14 классов только ФЛА₂, у млекопитающих – 13 подтипов ФЛА₁, 13 подтипов ФИ-ФЛС, два изофермента ФЛД. Представителей практически всех фосфолипаз мы исследовали, кроме ФЛА₁. В монографии, посвященной описанию активности фосфолипаз в норме и при патологии [52], проведен детальный анализ их функции и показано, что фосфолипазы – маркеры социально опасных заболеваний (рис. 5). Например, на сегодняшний день ЛП-ФЛА₂ рассматривается как важный сердечно-сосудистый маркер, независимый от традиционных факторов риска и независимый предиктор риска развития ишемической болезни сердца.

На основе данных исследований с привлечением нескольких тысяч международных экспертов по предсказанию наиболее перспективных научных направлений в ближайшей и среднесрочной перспективе [53], по нашему мнению, в области прикладной энзимологии следует выделить 10 наиболее важных задач.

1. Разработка биокатализаторов (оксидоредуктазы, лигазы, синтазы и др.), используемых для создания сенсорных устройств, в процессах тонкого органического синтеза, для получения синтонов и т. д.

2. Разработка новых методов выделения и очистки биокатализаторов, их иммобилизации и стабилизации, использования в нетрадиционных и неводных средах.

3. Исследование пространственной структуры биокатализаторов физико-химическими методами (рентгеноструктурный анализ, ядерно-магнитный резонанс и др.) и компьютерного моделирования.

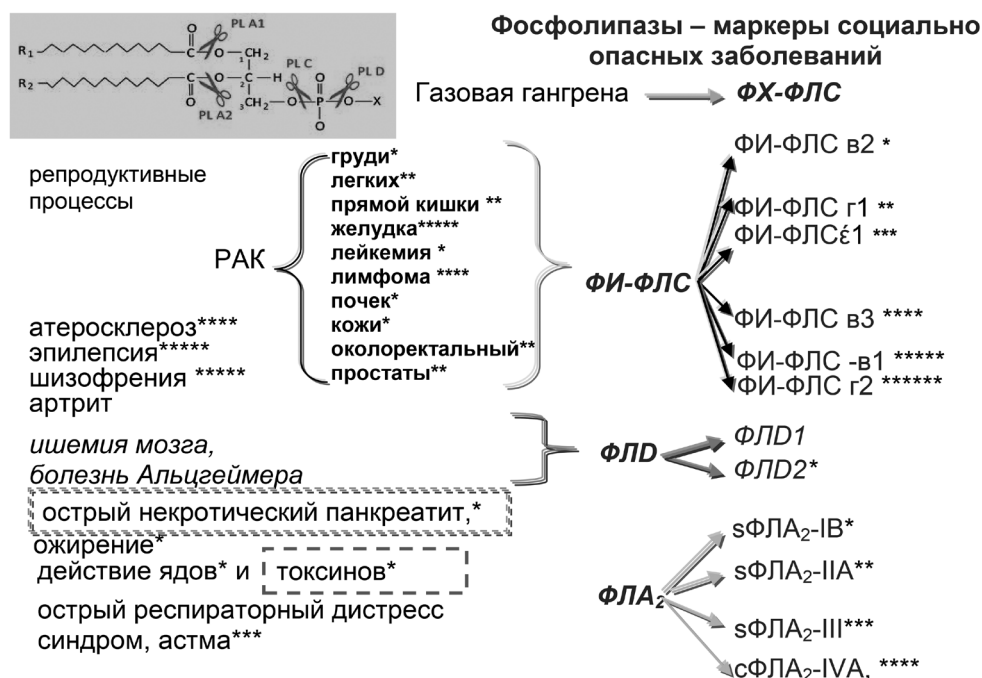


Рис. 5. Проблемы, требующие решения в результате изучения фосфолиполиза. Двойным пунктиром обозначен наш текущий интерес, одинарным – перспектива

Fig. 5. Problems to be solved during the study of phospholipolysis. Double dotted line denotes our current interest, single dotted line – perspective

4. Перспективные ферменты для использования в биокаталитических процессах, в том числе устойчивые к экстремальным условиям реальных биотехнологических процессов (высокой температуре, кислотности или щелочности, присутствию солей, органических растворителей и т. д.).

5. Исследование механизмов биокатализа, выявление физико-химических закономерностей, лежащих в основе ускорения химических реакций биокатализаторами.

6. Разработка искусственных катализаторов, использующих принципы биокатализа.

7. Создание рекомбинантных ферментов с улучшенными технологическими свойствами, в том числе осуществляющих несколько последовательных реакций.

8. Создание научно-технологической базы по биокаталитическим процессам получения соединений, востребованных в различных отраслях промышленности.

9. Создание готовых форм ферментных препаратов для последующего применения в различных областях промышленности.

10. Новые верифицированные методики биотестирования и биоиндикации на основе ферментов: выявление новых тест-объектов биомониторинга и биотестирования; создание и внедрение эффективных биотест-систем, в том числе экспрессных, на основе биологического материала и живых организмов.

На основе имеющихся разработок в области изучения фосфолиполиза наиболее актуальными и практически значимыми для исследования являются следующие задачи: применение природных катализаторов фосфолиполиза в синтезе и при анализе чувствительности к ферментативной деградации производных липидов и их конъюгатов с нуклеозидами; фундаментальные исследования белок-белкового взаимодействия: ФЛАазы – СУР450 и ФЛАазы – *Hb*, а также исследование взаимодействия ФЛАазы с ксенобиотиками в ряду антибиотиков, стероидов, пептидов и др.; продолжение скрининга биологического действия физиологически активных соединений с потенциальным антигемолитическим действием на основе использования ФЛА₂ змеи, с антипанкреатитным действием ФЛА₂ панкреаса; предварительный скрининг биобезопасности средств защиты растений с использованием разработанной тест-системы, состоящей из 4 тест-контролей; разработка тест-системы по определению общей антиоксидантной способности биологических жидкостей с использованием липидной фазы, например для тестирования не только крови при конкретных патологиях, но и соков и других пищевых продуктов; модификация оригинальной тест-системы для выявления воспалительных процессов желудочно-кишечного тракта на основе определения общей активности фосфолипазы А₂ [54], а также совсем нового направления изучения токсичности бактериальных фосфолипаз А₂ и разработка методики тест-системы на основе использования фосфолипаз А₂ в качестве бактерицидных агентов, как новых средств борьбы с инфекционными заболеваниями, вызванными патогенными микроорганизмами.

Заключение. Следует отметить, что успехи в развитии отечественной прикладной энзимологии в области исследования ЦР450 отмечены Межгосударственной премией ГДР и СССР 1988 года (А. А. Ахрем, В. Л. Чашин, В. М. Шкуматов, С. А. Усанов, К. Рукпауль, Х. Райн, Г.-Р. Ениг и Г. Сметан); в области химико-энзиматической модификации компонентов нуклеиновых кислот и биохимического моделирования – Государственной премией Республики Беларусь 2004 года (Е. Н. Калиниченко, Н. М. Литвинко, И. А. Михайлопуло, Г. В. Зайцева, А. И. Зинченко, П. Т. Петров); в области мультиферментного каскадного превращения углеводов в нуклеазиды – Межгосударственной премией Российской академии наук и Национальной академии наук Беларуси 2015 года (В. А. Степченко, Ю. А. Соколов, И. А. Михайлопуло). Представленные в этом обзоре данные показывают имеющийся значительный потенциал в изучении важнейших практически значимых аспектов прикладной энзимологии в области фосфолиполиза на основе углубленных исследований взаимосвязи «структура – функция» в условиях воздействия внутренних и внешних факторов от ксенобиотиков до ультрафиолетового облучения и радиации.

Благодарности. Автор выносит благодарность всем коллегам, участвовавшим в выполнении перечисленных выше исследований. Исследования в области изучения взаимосвязи «структура–функция» липолитических ферментов в процессе фосфолиполиза были поддержаны грантами Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований B01-063, B04-228, B04M-164, X07-181, 07M-188, X10-096.

Acknowledgements. Author is thankful to all the colleagues who participated in the implementation of the studies listed above. Studies considering the structure-function relationship of lipolytic enzymes in the process of phospholipolysis were supported by grants of the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research B01-063, B04-228, B04M-164, X07-181, 07M-188, X10-096.

Список использованных источников

1. Имобилизованные клетки и ферменты / ред. Дж. Вудворд. – М.: Мир, 1988 – 215 с.
2. Buchholz, K. Reaction engineering parameters of immobilized biocatalysis. In: *Advanced in biochemical engineering*. / Fiechter A. (ed.). – Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1982. – Vol. 24. – P. 39–41.
3. The Preparation and Properties of Tris(triphenylphosphine)halogenorhodium(I) and Some Reactions Thereof Including Catalytic Homogeneous Hydrogenation of Olefins and Acetylenes and Their Derivatives / J. A Osborn [et al.] // *Journal of the Chemical Society A*. – 1966. – P. 1711–1732.
4. Poulsen, P. B. Current applications of immobilized enzymes for manufacturing purposes / P. B. Poulsen. // *Biotechnol. Genet. Eng. Reviews*. – 1984. – Vol. 1. – P. 121–140.
5. Effect of ultrasound as a new method of studying conformational transitions in enzyme active-sites - pH-induced and temperature-induced conformational transitions in active-center of penicillin amidase / I. V. Berezin [et al.] // *FEBS Letters*, Elsevier BV (Netherlands). – 1975. – Т. 49, № 3. – С. 325–328.
6. Молекулярный полиморфизм ферментов человека – основа индивидуальной чувствительности к лекарствам. Суперкомпьютерное моделирование как метод анализа структурных изменений белка и его каталитической активности / С. Д. Варфоломеев [и др.] // *Изв. АН СССР. Сер. хим.* – 2016. – № 6. – С. 1592–1607.
7. Micellar enzymology – superactivity of enzymes in reversed micelles of surfactants solvated by water organic cosolvent mixtures / N. L. Klyachko [et al.] // *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. – 1992. – Vol. 57, N. 3. – P. 625–640.
8. Matrix design for bacteriolytic enzyme encapsulation / N. L. Klyachko [et al.] // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2006. – Vol. 16, N 4. – P. 293–299.
9. Influence of the lipid composition on the catalytic activity of acid phosphatase in reverse micelles / У. В. Кудряшова [и др.] // *Биохимия*. – 2009. – Т. 74, № 3. – С. 420–428.
10. Стабилизация щелочной протеиназы и целлюлаз комплексобразованием с хитозаном для применения в составе синтетических моющих средств / Е. В. Кудряшова [и др.] // *Биоорг. химия*. – 2009. – Т. 35, № 3. – С. 1–8.
11. Early diagnosis of lung cancer based on proteome analysis of exhaled breath condensate / K. U. Fedorchenko [et al.] // *Moscow University Chemistry Bulletin*. – 2016. – Vol. 71, N 2. – P. 134–139.
12. Proteomic analysis of exhaled breath condensate for diagnostics of respiratory system diseases / A. S. Kononikhin, K. U. Fedorchenko, A. M. Ryabokon [et al.] // *Biochemistry, Supplemental Series B*. – 2016. – Vol. 10, N 3. – P. 230–234.
13. Флуоресцентный иммуноанализ. Синтез, спектрально-флуоресцентные и иммунологические свойства конъюгатов корпропорфирина 1 с антителами / Д. Б. Папковский [и др.] // *Прикл. биохим. и микробиол.* – 1989. – Т. 25, № 4. – С. 548–557.
14. Isolation, structural organization and mechanism of action of mitochondrial steroid hydroxylating systems / A. A. Akhrem [et al.] // *Acta biol. med. Germ.* – 1979. – Vol. 38, N 2–3. – P. 257–273.
15. Influence of the charge and organization of the substrate on the activity of phosphatidylinositol-specific phospholipase C / A. A. Akhrem [et al.] // *Biochemistry (Moscow)*. – 1984. – Vol. 49, N 3. – P. 317–321.
16. Характеристика иммуноаффинной хроматографии и новый метод получения тиропероксидазы человека из субклеточных фракций щитовидной железы / О. В. Цыганова [и др.] // *Прикл. биохим. и микробиол.* – 2006. Т. 42, № 2. – С. 236–246.
17. Обращенные мицеллы ПАВ в органических растворителях – модель биологических мембран. / Д. И. Метелица, А. Н. Еремин // *Успехи биол. химии*. – 1988. – Т. 28. – С. 145–173.
18. Метелица, Д. И. Активация кислорода ферментными системами / Д. И. Метелица. – М.: Наука, 1982. – 255 с.
19. Метелица, Д. И. Моделирование окислительно-восстановительных ферментов / Д. И. Метелица. – Минск: Наука и техника, 1984. – 293 с.
20. Study of lipolysis in model membranes in the presence of positively charged soluble proteins / M. K. Naubatova [et al.] // *Biochemistry (Moscow)*, 1992. – Vol. 57, N 4. – P. 411–416.
21. Structural Insights into Aldosterone Synthase Substrate Specificity and Targeting Inhibition / N. Strushkevich [et al.] // *Mol. Endocrinol.* – 2013. – Vol. 27, N 2. – P. 315–324.
22. Метелица, Д. И. Активация кислорода ферментными системами – цитохромом P-450 и другими гемопротеинами / Д. И. Метелица // *Успехи химии*. – 1982. – Т. 51, № 11. – С. 1819–1848.
23. Catalytic activity and thermostability of dehydrogenase conjugates with cortisol and progesterone / D. I. Metelitsa [et al.] // *Bioconjugate Chemistry*. – 1991. – Vol. 2, iss. 5. – P. 309–316.
24. Иммунохимический анализ фосфолипаз A₂ и фосфолипазы C *Clostridium perfringens* / А. А. Ахрем [и др.] // *Изв. АН БССР. Сер. хим.* – 1977. № 5. – С. 113–118.
25. Recognition of Artificial Nucleobases by *E. coli* Purine Nucleoside Phosphorylase versus its Ser90Ala Mutant in the Synthesis of Base-Modified Nucleosides. Chem. / Fateev I. V. [et al.] // *A Eur. J.* – 2015. – Vol. 21. – P. 13401–13419.
26. Study of stability of liposomes, potential drug carriers, to the action of phospholipase A₂ / N. M. Litvinko [et al.] // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 1993. – Vol. 29, N 3. – P. 361–366.
27. Liposomes with phosphatidylethanol as a carrier for oral delivery of insulin: Studies in the rat / M. A. Kisel [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2001. – Vol. 216, N 1–2. – P. 105–114.
28. Рекомбинантный иммунотоксин scFv4D5-барназа, специфичный к с-ErbB2-позитивным клеткам рака молочной железы: фолдинг, стабильность, цитотоксическая активность / А. П. Власов [и др.] // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук*. – 2009. – № 1. – С. 5–13.

29. Метелица, Д. И. Иницирование и ингибирование свободнорадикальных процессов в биохимических пероксидных системах / Д. И. Метелица, Е. И. Карасёва // Прикл. биохим. и микробиол. – 2007. – Т. 43, № 5. – С. 537–564.
30. Высокоэффективные тест-системы оценки общей антиоксидантной активности биологических жидкостей человека / Д. И. Метелица [и др.] // Труды БГУ. – 2008. – Т. 3. Ч. 1. – С. 7–21.
31. Evidence That Compound I Is the Active Species in Both the Hydroxylase and Lyase Steps by Which P450_{sc} Converts Cholesterol to Pregnenolone:EPR/ENDOR/Cryoreduction / Annealing Studies / R. Davydov [et al.] // Biochemistry. – 2015. – Vol. 54. – P. 7089–7097.
32. Литвинко, Н. М. Активность фосфолипазы A₂ и C при биохимическом моделировании / Н. М. Литвинко. – Минск: Технопринт, 2003. – 350 с.
33. Способ выделения фосфолипазы A₂: пат. 8416 Республики Беларусь: МПК7 C12N 9/16 (2006)/Н.М. Литвинко; дата публ.: 30.08.2006.
34. Separation and purification of isoenzymes of phospholipase C of *Clostridium perfringens* / G. F. Shemanova [et al.] // Appl. Biochem. Microbiol. – 1978. – Vol. 14, N 3. – P. 314–318.
35. Литвинко, Н. М. Эндогенные фосфолипазы A₂ / Н.М. Литвинко, М. А. Кисель. – Минск: Наука и техника, 1991. – 270 с.
36. Litvinko, N. M. Anionic center of pancreatic phospholipase A₂ / N. M. Litvinko, Yu. I. Khurgin, E. D. Kaverzneva // Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR Division of Chemical Science. – 1976. – Vol. 25, N 7. – P. 1586.
37. Litvinko, N. M. Effect of low-molecular-weight substrate fragments and their analogs on activity of isoenzymes of phospholipase C from *Clostridium perfringens* of type A / N. M. Litvinko, Yu. I. Khurgin, G. F. Shemanova // Biochemistry (Moscow). – 1977. – Vol. 42, N 6 (II). – P. 838–842.
38. Получение антител к гидролитическим ферментам и выявление их в реакции пассивной гемагглютинации / Г. Ф. Шеманова [и др.] // Иммунология. – 1981. – № 1. – С. 43–46.
39. Литвинко, Н. М. Ингибирование фосфолипаз A₂ и C / Н. М. Литвинко // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2005. – № 4. – С. 113–124.
40. Антончик, Г. Н. Исследование белок-белкового взаимодействия цитохрома P-450 и фосфолипазы A₂ / Г. Н. Антончик, Т. Г. Гудко // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2015. – № 1. – С. 3–5.
41. Litvinko, N. M. The anionic site of hog pancreatic phospholipase A₂ / N. M. Litvinko, Yu. I. Khurgin, E. D. Kaverzneva // Biochemistry (Moscow). – 1977. – Vol. 42, N 1(I). – P. 68–75.
42. Litvinko, N. M. Formation of phospholipase A₂ complexes with nucleic acid fragments and methods for their disruption / N. M. Litvinko, A. P. Drozhdeniuk // Applied Biochemistry and Microbiology. – 1996. – Vol. 32, N 6. – P. 585–589.
43. Litvinko, N. M. Dynamics of formation of lysoforms on enzymatic hydrolysis of phosphatidylalkanol / N. M. Litvinko, S. V. Kuchuro, M. V. Zhukova // Biochemistry (Moscow). – 2002. – Vol. 67, N 9. – P. 1027–1031.
44. Litvinko, N. M. Hydrolysis of glycerophospholipids by the phosphatidylinositol-specific phospholipase C / N. M. Litvinko // Biophosphates and Their Analogous – Synthesis, Structure, Metabolism and Activity. – Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V. – 1987. – P. 315–320.
45. Литвинко, Н. М. Особенности фосфолиполиза под действием производных 1,3-циклогександиона / Н. М. Литвинко, Д. О. Герловский // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2012. – № 2. – С. 77–81.
46. Литвинко, Н. М. Использование толуольного раствора лецитина при выделении фосфолипазы A₂ из поджелудочной железы свиньи / Н. М. Литвинко // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 1999. – №4. – С. 63–67.
47. Изучение специфичности фосфолипазы A₂ на субстратсодержащих структурах, имеющих разную надмолекулярную организацию / А. А. Ахрем [и др.] // Биохимия. – 1989. – Т. 54, № 4. – С. 687–693.
48. Litvinko, N. M. Study of phospholipase A₂ hydrolysis using conversion of methemoglobin to hemoglobin / N. M. Litvinko, G. M. Andreyuk, M. A. Kisel // FASEB Journal. – 1997. – Vol. 11, N 9. (C.A.1306). – P. 2623.
49. Патент BY №019670 «Способ определения общей антиоксидантной способности биологической жидкости с использованием липидной фазы» / Н. М. Литвинко, Л. А. Скоростецкая, Д. О. Герловский; заявитель – Институт биоорганической химии НАН Беларусі, заявл. 13.01.11, заявка а 20110049.
50. Патент BY №019669. Композиция и способ определения общей антиоксидантной активности сыворотки крови / Н. М. Литвинко, Л. А. Скоростецкая, Д. О. Герловский; заявитель – Институт биоорганической химии НАН Беларусі, заявл. 13.01.11, заявка а 20110048.
51. Литвинко, Н. М. Межфазный катализ липолитических реакций в биоорганической химии: особенности и практическое применение / Н. М. Литвинко // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2015. – № 4. – С. 109–121.
52. Tappia, P. S. Phospholipases in Health and Disease / P. S. Tappia, N. S. Dhalla. – New York: Springer, 2014. – 410 p.
53. Долгосрочные приоритеты прикладной науки в России: / под ред. Л. М. Гохберга. – М.: Высш. шк. экономики, 2013. – 120 с.
54. Супрамолекулярный комплекс жирной кислоты с гемоглобином как индикатор фосфолиполиза для выявления экспериментального панкреатита / Литвинко [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларусі. – 2016. – Т. 60, № 1. – С. 82–87.

References

1. Bidei S. P., Brodelius P., Kabral I. M., *Immobilizovannye kletki i fermenty : metody* [Immobilized Cells and Enzymes], in Woodward, J. (ed.), Mir, Moscow, RU, 1988.
2. Buchholz K., “Reaction engineering parameters of immobilized biocatalysis”, in *Advanced in biochemical engineering*, Fiechter A. (ed.), 1982, vol.24, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 39–41.

3. Osborn J. A., Jardine F. H., Young, J. F., Wilkinson, G., "The Preparation and Properties of Tris(triphenylphosphine) halogenorhodium(I) and Some Reactions Thereof Including Catalytic Homogeneous Hydrogenation of Olefins and Acetylenes and Their Derivatives", *Journal of the Chemical Society A*, 1966, pp. 1711–1732.
4. Poulsen P. B., "Current applications of immobilized enzymes for manufacturing purposes", *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 1984, vol. 1, pp.121–140.
5. Berezin I. V., Klibanov A. M., Klyosov A. A., Martinek K., Svedas V. K., "Effect of ultrasound as a new method of studying conformational transitions in enzyme active-sites - pH-induced and temperature-induced conformational transitions in active-center of penicillin amidase", *FEBS Letters*, 1975, vol. 49, no. 3, pp. 325–328.
6. Varfolomeev S. D., Lushchekina S. V., Nemukhin A. V., Kulakova A. M., Kots E. D., Makhaeva G. F., Delakur E., Lokridzh O., Masson P., "Molecular polymorphism of human enzymes is the basis of individual sensitivity to drugs. Supercomputer modeling as a method of analysis of structural changes in protein and its catalytic activity", *Izvestiia Akademii nauk. Seriya khimicheskaya* [Russian Chemical Bulletin], 2016, no. 6, pp. 1592–1607.
7. Klyachko N. L., Bogdanova N. G., Levashov A. V., Martinek K., "Micellar enzymology – superactivity of enzymes in reversed micelles of surfactants solvated by water organic cosolvent mixtures", *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 1992, vol. 57, no. 3, pp. 625–640.
8. Klyachko N. L., Ignatenko O. V., Dmitrieva N. F., Eshchina A. S., Rainina E. I., Kazarov A. K., Kuptsova O. S., Levashov A. V., "Matrix design for bacteriolytic enzyme encapsulation", *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2006, vol. 16, no. 4, pp. 293–299.
9. Kudryashova E. V., Bronza V., Levashov A. V., "Influence of the lipid composition on the catalytic activity of acid phosphatase in reverse micelles", *Biokhimiia* [Biochemistry], 2009, vol. 74, no. 3, pp. 420–428.
10. Kudryashova E. V., Vasil'ev I. S., Zorov I. N., Sinitsyn A. P., Levashov A. V., "Stabilization of alkaline proteinase and cellulase by complexation with chitosan for use in synthetic detergents", *Bioorganicheskaya khimiia* [Russian Journal of Bioorganic Chemistry], 2009, vol. 35, no. 3, pp. 1–8.
11. Fedorchenko K. U., Ryabokon A. M., Kononikhin A. S., Mitrofanov S. I., Barmin V. V., Pikin O. V., Anaev E. H., Gachok I. V., Popov I. A., Nikolaev E. N., Chuchalin A. G., Varfolomeev S. D., "Early diagnosis of lung cancer based on proteome analysis of exhaled breath condensate", *Moscow University Chemistry Bulletin*, 2016, vol.71, no. 2, pp.134–139.
12. Kononikhin A. S., Fedorchenko K. Yu., Ryabokon A. M., Starodubtseva N. L., Popov I. A., Zavalova M. G., Anaev E. C., Chuchalin A. G., Varfolomeev S. D., Nikolaev E. N., "Proteomic analysis of exhaled breath condensate for diagnostics of respiratory system diseases", *Biochemistry, Supplemental Series B*, 2016, vol. 10, no. 3, pp. 230–234.
13. Papkovskii D. B., Savitskii A. P., Ugarova N. N., Berezin I. V., Ponomarev G. V., "Fluorescent immunoassay. Synthesis, Spectral-Fluorescent and Immunological Properties of Conjugates of Coproporphyrin 1 with Antibodies", *Prikladnaya biokhimiia i mikrobiologiia* [Applied Biochemistry and Microbiology], 1989, vol. 25, no. 4, pp. 548–557.
14. Akhrem A. A., Lapko V. N., Lapko A. G., Shkumatov V. M., Chashchin V. L., "Isolation, structural organization and mechanism of action of mitochondrial steroid hydroxylating systems", *Acta Biologica et medica germanica*, 1979, vol. 38, no. 2–3, pp. 257–273.
15. Akhrem A. A., Litvinko N. M., Kisel M. A., Gerasimene G. B., Makaryunaite Y. P., Kulene V. V., "Influence of the charge and organization of the substrate on the activity of phosphatidylinositol-specific phospholipase C", *Biokhimiia* [Biochemistry], 1984, vol. 49, no.3, pp. 317–321.
16. Tsyganova O. V., Kiseleva E. P., Vashkevich I. I., Priadko A. G., Sviridov O. V., "Characteristics of immunoaffinity chromatography and a new method for isolation of human thyroid peroxidase from subcellular fractions of thyroid gland", *Prikladnaya biokhimiia i mikrobiologiia* [Applied Biochemistry and Microbiology], 2006, vol. 42, no. 2, pp. 236–246.
17. Metelitsa D. I., Eremin A. N., "Reversed surfactant micelles in organic solvents - a model of biological membranes", *Uspekhi biologicheskoi khimii* [Advances in Biochemistry], 1988, vol. 28, pp. 145–173.
18. Metelitsa D. I., *Aktivatsiia kisloroda fermentnymi sistemami* [Oxygen activation by enzyme systems], Nauka, Moscow, RU, 1982.
19. Metelitsa D. I., *Modelirovanie okislitel'no-vosstanovitel'nykh fermentov* [Modeling of oxidation-reduction enzymes], Nauka i tekhnika, Minsk, BY, 1984.
20. Naubatova M. K., Litvinko N. M., Kisel M. A., Akhrem A. A., "Study of lipolysis in model membranes in the presence of positively charged soluble proteins", *Biokhimiia* [Biochemistry], 1992, vol. 57, no. 4, pp. 411–416.
21. Strushkevich N., Gilep A. A., Shen L., Arrowsmith C. H., Edward A. M., Usanov S. A., Park H.-W., "Structural Insights into Aldosterone Synthase Substrate Specificity and Targeting Inhibition", *Molecular Endocrinology*, 2013, vol. 27, no. 2, pp. 315–324.
22. Metelitsa D. I., "Oxygen activation by enzyme systems - cytochrome P-450 and other hemoproteins", *Uspekhi khimii* [Russian Chemical Reviews], 1982, vol. 51, no. 11, pp. 1819–1848.
23. Metelitsa D. I., Eryomin A. N., Markina V. L., Karasjova E. I., "Catalytic activity and thermostability of dehydrogenase conjugates with cortisol and progesterone", *Bioconjugate Chemistry*, 1991, vol. 2, iss. 5, pp. 309–316.
24. Akhrem A. A., Litvinko N. M., Shemanova G. F., Dmitrieva L. N., Mironova A. T., "Immunochemical analysis of phospholipase A₂ and phospholipase C of *Clostridium perfringens*", *Vesti Natsyional'noi akademii navuk Belarusi. Seriya khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 1977, no. 5, pp. 113–118.
25. Fateev I. V., Kharitonova M. I., Antonov K. V., Konstantinova I. D., Stepanenko V. N., Esipov R. S., Seela F., Temburnikar K. W., Seley-Radtke K. L., Stepchenko V. A., Sokolov Y. A., Miroshnikov A. I., Mikhailopol I. A., "Recognition of Artificial Nucleobases by E. coli Purine Nucleoside Phosphorylase versus its Ser90Ala Mutant in the Synthesis of Base-Modified Nucleosides", *Chemistry - A European Journal*, 2015, vol. 21 (38), pp. 13401–13419.

26. Litvinko N. M., Shumilina T. A., Naubatova M. K., Akhrem A. A., "Study of stability of liposomes, potential drug carriers, to the action of phospholipase A₂", *Applied Biochemistry and Microbiology*, 1993, vol. 29, no. 3, pp. 361–366.
27. Kisel M. A., Kulik L., Tsybovsky I. S., Vlasov A. P., Vorob'yov M. S., Kholodova E. A., Zabarovskaya Z. V., "Liposomes with phosphatidylethanol as a carrier for oral delivery of insulin: Studies in the rat", *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, vol. 216, no.1–2, pp.105–114.
28. Vlasov A. P., Shubenok D. V., Sereda V. V., Fima D. V., Kravchuk I. I., Odintsov S. G., Deev S. M., Martsev S. P., "Recombinant immunotoxin scFv4D5-barnase, specific for c-ErbB2-positive breast cancer cells: folding, stability, cytotoxic activity", *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2009, no. 1, pp. 5–13.
29. Metelitsa D. I., Karaseva E. I., "Initiation and inhibition of free-radical processes in biochemical peroxide systems", *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia* [Applied Biochemistry and Microbiology], 2007, vol. 43, no. 5, pp. 537–564.
30. Metelitsa D. I., Piven' N. V., Shadyro O. I., Grigorenko Iu. A., Dukhverchik L. N., Denisevich N. P., "Highly effective test systems for assessing the overall antioxidant activity of human biological fluids", *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Fiziologicheskie, biokhimicheskie i molekuliarnye osnovy funkcionirovaniia biosistem* [Proceedings of the Belarusian State University. Physiological, biochemical and molecular basis of functioning of biosystems], 2008, vol. 3, pt. 1, pp. 7–21.
31. Davydov R., Strushkevich N., Smil D., Yantsevich A., Gilep A., Usanov S., Hoffman B. M., "Evidence That Compound I Is the Active Species in Both the Hydroxylase and Lyase Steps by Which P450_{sc} Converts Cholesterol to Pregnenolone: EPR/ENDOR/Cryoreduction/Annealing Studies", *Biochemistry*, 2015, vol. 54, pp. 7089–7097.
32. Litvinko N. M., *Aktivnost' fosfolipazy A₂ i S pri biokhimicheskoi modelirovani* [The activity of phospholipase A₂ and C in biochemical modeling], UP "Tekhnoprint", Minsk, BY, 2003.
33. Litvinko N. M., Gosudarstvennoe nauchnoe uchrezhdenie "Institut bioorganicheskoi khimii Natsional'noi akademii nauk Belarusi", *Sposob vydeleniia fosfolipazy A₂* [A method for isolating phospholipase A₂], Baza patentov Respubliki Belarus', BY, Pat. 8416, 2002.
34. Shemanova G. F., Dmitrieva L. N., Litvinko N. M., Firsava T. M., Bulanov N. V., "Separation and purification of isoenzymes of phospholipase C of *Clostridium perfringens*", *Applied Biochemistry and Microbiology*, 1978, vol. 14 (3), pp. 314–318.
35. Litvinko N. M., Kisel' M. A., *Endogennye fosfolipazy A₂* [Endogenous phospholipase A₂], Nauka i tekhnika, Minsk, BY, 1991.
36. Litvinko N. M., Khurgin Yu. I., Kaverzneva E. D., "Anionic center of pancreatic phospholipase A₂", *Izvestiia Akademii nauk. Seriya khimicheskaya* [Russian Chemical Bulletin], 1976, vol. 25, no. 7, p. 1586.
37. Litvinko N. M., Khurgin Yu. I., Shemanova G. F., "Effect of low-molecular-weight substrate fragments and their analogs on activity of isoenzymes of phospholipase C from *Clostridium perfringens* of type A", *Biokhimiia* [Biochemistry], 1977, vol. 42, no. 6 (II), pp. 838–842.
38. Shemanova G. F., Khurgin Iu. I., Litvinko N. M., Firsava T. M., Dmitrieva L. N., "The preparation of antibodies to hydrolytic enzymes and their detection in the passive hemagglutination reaction", *Immunologiia* [Immunology], 1981, no. 1, pp. 43–46.
39. Litvinko N. M., "Inhibition of phospholipases A₂ and C", *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2005, no. 4, pp. 113–124.
40. Antonchik G. N., Gudko T. G., "Investigation of the protein-protein interaction of cytochrome P-450 and phospholipase A₂", *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2015, no. 1, pp. 3–5.
41. Litvinko N. M., Khurgin Yu. I., Kaverzneva E. D., "The anionic site of hog pancreatic phospholipase A₂", *Biokhimiia* [Biochemistry], 1977, vol. 42, no. 1(I), pp. 68–75.
42. Litvinko N. M., Drozhdeniuk A. P., "Formation of phospholipase A₂ complexes with nucleic acid fragments and methods for their disruption", *Applied Biochemistry and Microbiology*, 1996, vol. 32, no. 6, pp. 585–589.
43. Litvinko N. M., Kuchuro S. V., Zhukova M. V., "Dynamics of formation of lysoforms on enzymatic hydrolysis of phosphatidylalkanol", *Biokhimiia* [Biochemistry], 2002, vol. 67, no. 9, pp. 1027–1031.
44. Litvinko N. M., "Hydrolysis of glycerophospholipids by the phosphatidylinositol-specific phospholipase C", *Biophosphates and Their Analogous – Synthesis, Structure, Metabolism and Activity*, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, NL, 1987, pp. 315–320.
45. Litvinko N. M., Gerlovskii D. O., "Features of phospholipolysis under the action of 1,3-cyclohexanedione derivatives", *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2012, no. 2, pp. 77–81.
46. Litvinko N. M., "The use of a toluene solution of lecithin in the isolation of phospholipase A₂ from the pig pancreas", *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 1999, no. 4, pp. 63–67.
47. Akhrem A. A., Litvinko N. M., Shumilina T. A., Linnik O. I., Kisel' M. A., "A study of the specificity of phospholipase A₂ on substrate-containing structures having a different supramolecular organization", *Biokhimiia* [Biochemistry], 1989, vol. 54, no. 4, pp. 687–693.
48. Litvinko N. M., Andreyuk G. M., Kisel M. A., "Study of phospholipase A₂ hydrolysis using conversion of methemoglobin to hemoglobin", *FASEB Journal*, 1997, vol. 11, no. 9 (C.A.1306), p. 2623.
49. Litvinko N. M., Skorostetskaia L. A., Gerlovskii D. O., Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, *Sposob opredeleniia obshchei antioksidantnoi sposobnosti biologicheskoi zhidkosti s ispol'zovaniem*

lipidnoi fazy [A method for determining the total antioxidant capacity of a biological fluid using a lipid phase], Baza patentov Respubliki Belarus', BY, Pat. 019670, 2015.

50. Litvinko N. M., Skorostetskaia L. A., Gerlovskii D. O., Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, *Kompozitsiia i sposob opredeleniia obshchei antioksidantnoi aktivnosti syvorotki krovi* [Composition and method for determination of total antioxidant activity of blood serum], Baza patentov Respubliki Belarus', BY, Pat. 019669, 2015.

51. Litvinko N. M., "Interphase catalysis of lipolytic reactions in bioorganic chemistry: features and practical application (review)", *Vesti Natsional'noi akademii navuk Belarusi. Seryia khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2015, no. 4, pp. 109–121.

52. Tappia P. S., Dhalla N. S., *Phospholipases in Health and Disease*, Springer, New York, US, 2014.

53. Gokhberg L. M. (ed.), *Dolgosrochnye priority prikladnoi nauki v Rossii* [Long-term priorities of applied science in Russia], Natsional'nyi issledovatel'skii universitet "Vysshiaia shkola ekonomiki", Moscow, RU, 2013.

54. Litvinko N. M., Skorostetskaia L. A., Gudko T. G., Timokhova M. M., Kamyshnikov V. S., Vizhinis E. I., Vorobei V. A., "Supramolecular fatty acid complex with hemoglobin as an indicator of phospholipolysis for detection of experimental pancreatitis", *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus], 2016, vol. 60, no. 1, pp. 82–87.

Информация об авторах

Литвинко Наталья Михайловна – д-р. хим. наук, доцент, зав. лаб., Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: al_h@mail.ru.

Information about the authors

Natalia M. Litvinko – D. Sc. (Chemistry), Associate Professor, Head of Laboratory, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus), E-mail: al_h@mail.ru.