

АГЛЯДЫ
REVIEWS

УДК 577.152.3
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2020-56-4-494-512>

Поступила в редакцию 16.08.2020
Received 16.08.2020

Н. М. Литвинко

Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

МНОГОЦЕЛЕВЫЕ БИОРЕАКТОРЫ НА ОСНОВЕ ФОСФОЛИПОЛИЗА

Аннотация. Представлен обзор основных экспериментальных результатов в области новых направлений (энзимотерапия и энзимодиагностика) практического использования ферментативного гидролиза фосфолипидов (фосфолиполиза), нарушение которого приводит к развитию ряда социально опасных заболеваний: онкологических, сердечно-сосудистых, инфекционных, воспалительных и т. д. Разработан ряд многоцелевых биореакторов на основе использования ферментов фосфолипаз A_2 (ФЛА₂), принимающих участие в фосфолиполизе: одноферментные нанореакторы ФЛА₂-лиганд и сопряженные биферментные нанореакторы; ФЛА₂-гемоглобин; ФЛА₂-миоглобин; ФЛА₂-цитохром P-450 (СУР2В4) и ФЛА₂-цитохром P-450 (СУР3А4).

Ключевые слова: фосфолипаза A_2 , фосфолиполиз, диагностические биосистемы

Для цитирования. Литвинко, Н. М. Многоцелевые биореакторы на основе фосфолиполиза / Н. М. Литвинко // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2020. – Т. 56, № 4. – С. 494–512. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2020-56-4-494-512>

N. M. Litvinko

Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

MULTI-PURPOSE BIOREACTORS BASED ON PHOSPHOLIPOLYSIS

Abstract. Overview of the main experimental results in the field of new directions of phospholipolysis practical applications – enzyme therapy and diagnostics are presented. Phospholipases, which are enzymes that hydrolyze phospholipids, are known as markers of socially dangerous diseases: oncological, cardiovascular, infectious, inflammatory, etc. We proposed a number of diagnostic biosystems based on phosphatideacylhydrolases and hemoproteins: Phospholipase A_2 -ligand, Phospholipase A_2 -cytochrome P450, Phospholipase A_2 -myoglobin, Phospholipase A_2 -hemoglobin. The latter system was used to produce and implement for the first time in the clinical practice the diagnostic kit PLA₂-PHOA for identifying patients with necrotic pancreatitis. The results of preclinical and clinical testing of the PLA₂-PHOA kit for the detection of pancreatitis based on the determination of the activity of phospholipase A_2 of blood are presented and discussed.

Keywords: phospholipase A_2 , phospholipolysis, diagnostic biosystems

For citation. Litvinko N. M. Multi-purpose bioreactors based on phospholipolysis. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*, 2020, vol. 56, no. 4, pp. 494–512 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2020-56-4-494-512>

Введение. Фосфолиполиз или расщепление фосфолипидов в организме осуществляется гидролазами липидного метаболизма, относящимися к классу фосфолипаз, среди которых наиболее изучено суперсемейство фосфолипаз A_2 (ФЛА₂, КФ 3.1.1.4), включающих 16 таксономических типов [1–4]. Так, по имеющимся в настоящее время сведениям, геном человека кодирует более 30 (даже 50) ФЛА₂ или сходных по функции ферментов [5]. Фосфолипазы и продукты осуществляемых ими ферментативных процессов участвуют в многоэтапном каскаде биохимических реакций, имеющих большое значение в обеспечении жизнедеятельности организма и, в частности, отвечающих за передачу внешних сигналов на межклеточном уровне. ФЛА₂ – липолитический фермент, катализирующий гидролиз сложноэфирной связи во втором положении глицеринового скелета молекулы фосфолипидов, составляющих более 60 % клеточной мембраны.

Метаболические функции ФЛА₂ разнообразны: от участия в осуществлении барьера кожных покровов [6], переваривания фосфолипидов пищи, до генерации важнейших внутриклеточных мессенджеров, а также модуляции апоптоза при патологиях [5]. При воздействии ФЛА₂ на фосфолипиды клеточных мембран образуются биоактивные лизофосфолипиды и жирные кислоты, в том числе арахидоновая кислота, которая в дальнейшем превращается в мощные медиаторы биохимических процессов – простагландины (ПГ), лейкотриены и тромбоксаны. Простагландины увеличивают скорость тока крови и инфильтрацию лейкоцитов к очагам воспаления, чем способствуют развитию воспалительного процесса. Лизофосфолипид, образующийся при гидролизе фосфатидилхолинов под действием фосфолипазы А₂, является предшественником фактора активации тромбоцитов – еще одного медиатора воспаления.

Значительное увеличение активности ФЛА₂ в органах и тканях происходит при многих заболеваниях, угрожающих жизни человека, – остром некротическом панкреатите, развитии воспалительных [7] и онкологических процессов, тромбообразовании, ишемии тканей, астмы и аллергии [8], язвенной болезни, отеках вследствие радиационного поражения и др. [9, 10]. Многие заболевания, например такие, как атеросклероз, диабет, ревматоидный артрит, инсульт, инфаркт миокарда, острые и хронические воспалительные процессы, характеризуются сочетанием перекисного окисления липидов с повышенной ферментативной активностью ФЛА₂ [11].

1. Фосфолипазы А₂ и их взаимосвязь с воспалительными процессами, как основа клинико-диагностических методов. Как известно, воспалительный процесс – это комплексный ответ организма на болезнетворное действие, включающий на фоне активации иммунной системы изменение проницаемости сосудов и накопление внеклеточной жидкости, содержащей широкий круг биоактивных компонентов, в том числе белков и пептидов острой фазы. Полагают, что активизирующиеся при воспалении клетки, в том числе нейтрофилы, моноциты и макрофаги, являются источником циркулирующей фосфолипазы А при непанкреатических заболеваниях.

Индикатором воспаления в клинической практике в настоящее время считается уровень С-реактивного белка (CRP) в крови больного. При многих патологических состояниях отмечается тесная корреляция между концентрацией фосфолипазы А₂ и уровнем CRP. Поэтому фосфолипазу А₂ также относят к белкам острой фазы. Хотя традиционное определение уровня CRP методически проще, определение фосфолипазной активности позволяет лучше понять патологические состояния и дать дополнительную информацию относительно прогноза различных нарушений [11]. Наибольший вклад в развитие и распространение воспалительных процессов в организме среди липолитических ферментов вносят низкомолекулярные секреторные фосфолипазы А₂ (типа IB, IIA и схожие с ними типы V, X) и высокомолекулярная липопротеин-ассоциированная фосфолипаза А₂ (ЛП-ФЛА₂) [12].

Клиническое значение определения фосфолипазной активности в сыворотке крови больных и использование этих данных в прогностических целях для лечения пациентов интенсивной терапии обсуждается в работе [13].

В связи с этим ферменты суперсемейства ФЛА₂ используются как биомаркеры ряда заболеваний. Например, на сегодняшний день ЛП-ФЛА₂ рассматривается как важный сердечно-сосудистый маркер, независимый предиктор риска развития ишемической болезни сердца, ФЛА₂ типа IB – острого некротического панкреатита, а ФЛА₂ типа IIA предлагается как биомаркер множественных патологий, таких как сепсис, рак простаты, желудка и легких [14]. Ряд примеров использования фосфолипаз в медицине для диагностики представлен в таблице.

Из изложенного в таблице видно, что имеющиеся способы определения активности фосфолипаз А₂ в биологических объектах достаточно разнообразны. В них используют прямое определение продуктов реакции или опосредованное воздействие этих продуктов на специфические агенты, идентифицируемые с помощью титрования, флуорометрии, колориметрии и других физико-химических методов. Однако приведенные выше методы отличаются многостадийностью, разной степенью чувствительности, воспроизводимости, пригодности к определению фосфолипаз разной специфичности (А₁ и А₂) в биологических жидкостях, а также имеют другие недостатки. В них используются неприродные синтетические субстраты, требующие трудозатратных сложных синтезов, ферментативный гидролиз которых отличается от нативного субстрата и не всегда адекватно отражает активность фосфолипаз.

Применение фосфолипаз A₂ в медицине для диагностики
Applications of phospholipases A₂ in medicine for diagnostics

| Фермент | Диагностика | Способ детекции | Источник |
|--|--|---|----------|
| ФЛА в сыворотке крови | Вирусных гепатитов и подпеченочных желтух | Титриметрический (ацидометрический) метод-титрование жирных кислот щелочью | [15] |
| ФЛА ₂ в синовиальной жидкости и в сыворотке крови | Воспалительных процессов | Спектрофотометрический метод с использованием окрашенных (хромофорных) субстратов | [16] |
| ФЛА ₂ в бронхо-альвеолярной жидкости | Кистозного фиброза | Радиометрический метод | [17] |
| Цитозольная ФЛА ₂ IV типа в сыворотке крови | Дисфункции клеточной сигнальной системы, психических заболеваний | Иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунный, иммунолюминисцентный, иммунофлуоресцентный и иммунологический методы с элементами биосенсорной технологии | [18] |
| ФЛА ₂ IV типа в сыворотке крови | Воспалительных процессов, в том числе панкреатита | Иммуноферментный анализ, флуориметрический и фотометрический метод с использованием хромофорного субстрата | [19–24] |
| ФЛА ₂ IIА типа в сыворотке крови | Рака простаты и доброкачественной гиперплазии простаты | Радиоиммунный, иммуногистохимический, иммунохимический (ELISA) методы, метод гибридизации, анализ конкурентного связывания, Вестерн-блоттинг и др. | [25] |
| ФЛА ₂ в биологическом объекте | Ревматоидного артрита | Уровень белка, активирующего фосфолипазу А | [26] |
| Общая активность iФЛА, iФЛАβ и цФЛА ₂ в биологическом объекте | Онкозаболеваний гинекологической сферы, в том числе эпителиального рака яичников | Флуорометрический анализ | [27] |
| ФЛА ₂ в спинномозговой жидкости | Состояния проницаемости гематоэнцефалического барьера | Флуорометрический анализ | [28] |
| Липопроteid-ассоциированная ФЛА ₂ (ЛП-ФЛА ₂), или ФАТ-гидролаза в крови | Риска развития инфарктов и инсультов | Колориметрический анализ | [29–32] |
| ЛП-ФЛА ₂ | Риска развития инфарктов и инсультов | Иммунохимический метод с использованием гибридного иммунозахвата | [33] |
| ЛП-ФЛА ₂ | Заболеваний коронарных артерий | Флуорометрический анализ | [34] |
| ЛП-ФЛА ₂ | Спинально-опосредованных воспалительных процессов | Радиометрический метод – использование радиоактивно меченных синтетических фосфолипидов, содержащих ¹⁴ С либо ³ Н-меченные жирные кислоты по sn-2 положению | [35] |
| ЛП-ФЛА ₂ | Спинально-опосредованные воспалительные процессы | Позитрон-эмиссионная томография или компьютерная томография на основе эмиссии одиночного фотона | [36] |

2. Структурно-функциональные особенности фосфолипаз и их использование для прикладных исследований. В лаборатории прикладной энзимологии Института биоорганической химии НАН Беларуси накоплен значительный потенциал в изучении важнейших практически значимых аспектов структурной химии 10 фосфолипаз разных классов (ФЛА₂ ядов трех змей и пчелы, панкреаса свиньи, человека; трех изоформ микробных ФЛС и D₁ – из капусты), а также в области их взаимодействия с ферментами стероидогенеза (CYP2B4 и CYP3A4) на основе углубленных исследований взаимосвязи структура–функция в условиях воздействия внутренних и внешних факторов на гидролиз фосфолипидов (фосфолиполиз) [37].

Фосфолипазы уникальные ферменты: они являются хорошо растворимыми в воде белками, а субстрат – гидрофобные фосфолипиды, образующие в воде супрамолекулярные комплексы – мицеллы, двухслойные и многослойные образования, так называемые липосомы или ламеллы (рис. 1). Поэтому у этих катализаторов, которые работают на поверхности раздела «липид–вода»

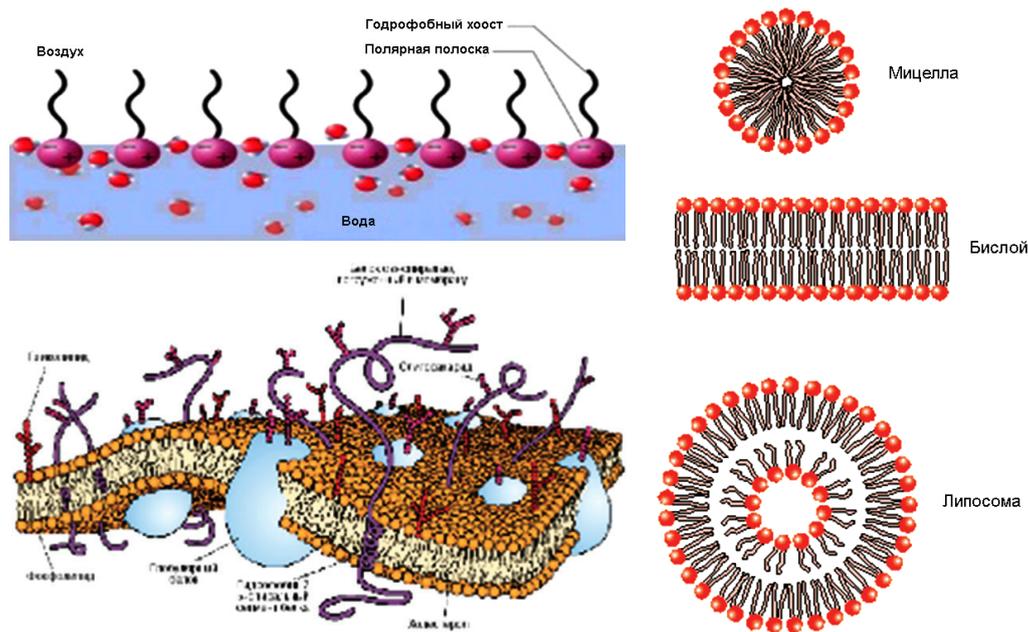


Рис. 1. Надмолекулярная структура субстрата фосфолипаз

Fig. 1. Supramolecular structure of the phospholipase substrate

и являются ферментами межфазного катализа, в отличие от других ферментов в молекуле, кроме традиционного каталитически активного центра, имеется дополнительный участок на поверхности глобулы для прикрепления к межфазной поверхности – сайт распознавания поверхности (СРП). Лимитирующей стадией в фосфолиполизе является стадия взаимодействия ФЛА₂ с поверхностью раздела фаз, т. е. с СРП.

Мы установили в структуре фосфолипаз новые, исключительно важные для катализа элементы и их свойства: анионный сайт в каталитическом центре фермента, более значимый для фосфолипаз С, чем для фосфолипаз А₂; не только одинаковые участки на поверхности белка, отвечающие за взаимодействие с антителами, впервые полученными для фосфолипаз, но и наличие отличающихся областей на поверхности, которые и обуславливают разную специфичность одного типа фосфолипаз; сходство первичной структуры фосфолипаз и пептидаз, особенно в области активного центра, что позволило впервые отнести фосфолипазы к типу «сериновых катализаторов»; наличие белок-белкового взаимодействия между фосфолипазами и цитохромом Р450 как прямого, так и опосредованного при утилизации лекарственных средств [38]. При моделировании клеточной мембраны в виде протеолипосом установлено, что включение белков (интегральных, периферических, растворимых) в модельные мембраны модулирует фосфолиполиз, особенно в прибелковом слое.

Что касается функции, то нами установлено, что при взаимодействии фермента с субстратом роль химического строения субстрата второстепенна. На первый план при фосфолиполизе выходит супрамолекулярная организация субстрата. По степени ускорения химической реакции в зависимости от организации межфазной поверхности формы субстрата можно расположить следующим образом: одиночные молекулы, липосомы (в виде сэндвича), монослой на поверхности раздела липид–воздух, смешанные мицеллы с детергентами.

Количественно фосфолиполиз оценивается не одной константой Михаэлиса, характеризующей каталитический процесс у других ферментов, а также константой связывания фермента с поверхностью раздела «липид–вода» [39]. Их активность зависит от надмолекулярной структуры, заряда, физико-химического состояния (кристаллическое или жидкокристаллическое) и упаковки (цилиндрическая, гексагональная, конусообразная) фосфолипидов в межфазной поверхности. Например, с увеличением отрицательного заряда в составе мицеллярной межфазной поверхности начальная скорость панкреатической ФЛА₂ увеличивается в 2–2,5 раза [40]. Благодаря их

стерической и позиционной специфичности ΦLA_2 являются ценным инструментом в химии и биохимии липидов. Ферменты суперсемейства ΦLA_2 и $\Phi\text{ЛС}$ используют для установления позиционного распределения жирных кислот при анализе фосфолипидов, для разделения рацемических смесей липидов, а также в синтезе липидов для получения фосфолипидов со смешанным составом жирных кислот [41].

Липолитические ферменты, как показано на примере 1,3-циклогександионов [40], обладают особым видом специфичности – поверхностной специфичностью, которая характеризует способность липолитического фермента присоединяться лишь к одной или нескольким организованным поверхностям раздела липид–вода и осуществлять предпочтительный гидролиз, т. е. с более высокими скоростями одного и того же липида в составе одной или нескольких супрамолекулярных формах организации субстрата (мономолекулы, супрамолекулярные агрегаты – мицеллы, ламеллы, липопротеиновые комплексы, цельные клеточные мембраны).

При этом обнаружено, что поверхностная специфичность фосфолипаз, строго соблюдаемая в обычных условиях, может кардинально изменяться под действием ксенобиотиков, например циклогександионов. А при изменении заряда межфазной поверхности субстрата фосфатидилинозитспецифичная фосфолипаза С (ФИ-ФЛС) теряет свою абсолютную специфичность – высший неизменяемый тип специфичности, известный для ферментов (рис. 2). Изменение организации молекул ФЛ от бислоя к мицелле, а также усиление отрицательного заряда мицеллы за счет дезоксихолата натрия (ДОХ) или замена на положительный в мицеллах с цетилтриметиламмоний бромидом (ЦТАБ) приводит к потере ФИ-ФЛС ее специфичности: хотя ФИ гидролизует на том же уровне, происходит разрушение и других ФЛ [42].

Таким образом, полученные новые фундаментальные знания привели нас к развитию прикладных исследований в таких направлениях, как использование этих ферментов для обнаружения потенциальных, терапевтически важных соединений (энзимотерапия) и определение активности энзимов как маркеров патологических процессов (энзимодиагностика). В рамках первого направления решались следующие задачи: определение физиологической активности химических соединений; противоэнзимная устойчивость липосом как контейнеров для лекарств; установление безопасных доз антибиотиков. В рамках второго направления решаются такие задачи: диагностика панкреатита; контроль биобезопасности пестицидов; оценка антиоксидантного потенциала организма; вирулентность фосфолипаз.

Для обеспечения исследований в этих направлениях разработан ряд биокаталитических систем: одноферментные нанореакторы ΦLA_2 -лиганд и сопряженные биферментные нанореакторы; ΦLA_2 -гемоглобин[44–49]; ΦLA_2 -миоглобин; ΦLA_2 -СУР2В4 и ΦLA_2 -СУР3А4 [50], ФЛ-миоглобин [51] (рис. 3).

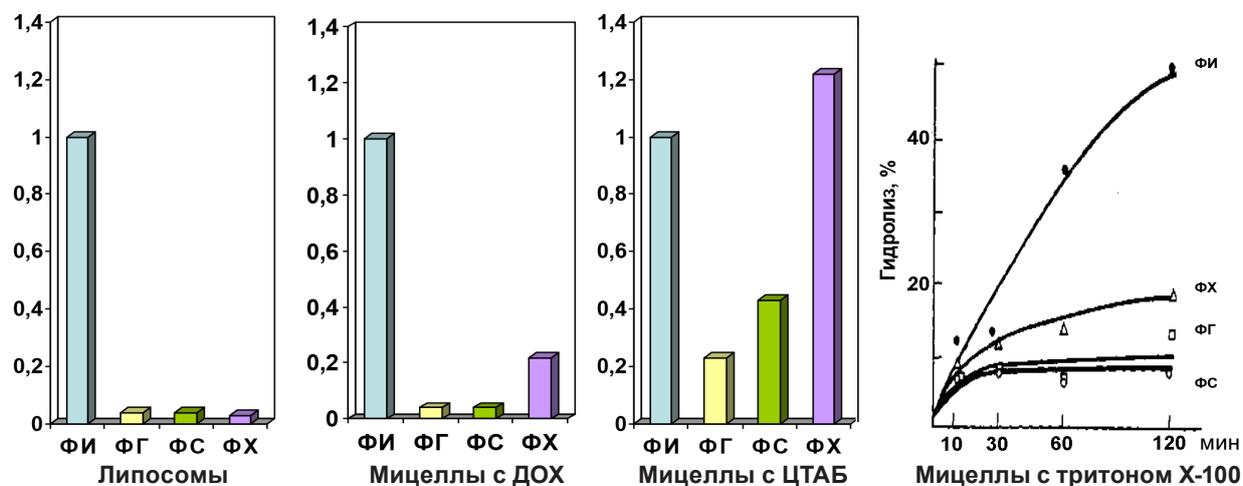


Рис. 2. Специфичность ФИ-ФЛС к глицерофосфолипидам в составе ламеллярной и мицеллярной межфазной поверхности разного заряда (за единицу принята скорость гидролиза ФИ) [42]

Fig. 2. Specificity of PI-PLC to glycerophospholipids in the composition of lamellar and micellar interfacial surfaces of different charges (the rate of PI hydrolysis is taken as a unit) [42]

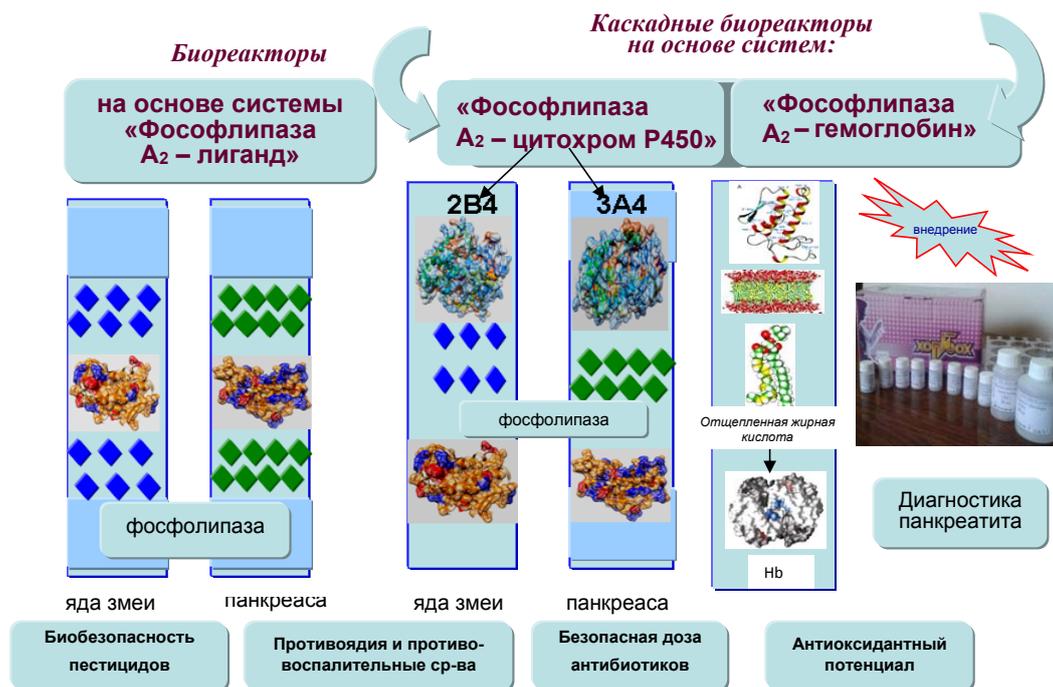


Рис. 3. Разработанные многоцелевые биореакторы на основе фосфолиполиза. Структуры белков взяты из Базы данных белков (PDB: PLA₂ (4g5i), Hb (3odq))

Fig. 3. Developed multipurpose bioreactors based on phospholipolysis. Protein structures are taken from the Protein Database (PDB: PLA₂ (4g5i), Hb (3odq))

3. Одноферментные нанореакторы ФЛА₂-лиганд. Одним из распространенных современных методов изучения фермент-лигандных взаимодействий, в том числе и представителей семейства ФЛА₂, является их оценка путем компьютерного моделирования (докинга) [52], которое впоследствии обязательно требует экспериментального подтверждения.

Участие внутриклеточных, секреторных и кальций-независимых ФЛА₂ (iФЛА₂) в воспалительных процессах делает их привлекательными мишенями для разработки мощных и селективных ингибиторов [53, 54]. Для понимания связывания и взаимодействия ингибиторов внутриклеточных и кальций-независимых iФЛА₂ использовалось моделирование HD-XMS и молекулярной динамики [55]. Фторокетоновые ингибиторы были идентифицированы как мощные ингибиторы в 2010 г. [56]. Был обнаружен новый класс ингибиторов iФЛА₂, который содержит гетероциклическое кольцо вместо фторметиловой группы [57]. Моделирование молекулярной динамики показало, что карбонильная группа ингибитора образует водородные связи с оксианионным отверстием (Gly486/Gly487) и гетероциклическим кольцом с Asp658 (рис. 4). Гидрофобный «хвост» ингибитора связывается в кармане, где обычно связывается *sn*-2 жирная кислота.

Вместе с тем фосфолипазы уже давно используются напрямую в эксперименте как индикаторы ингибиторов фосфолиполитических процессов. Так, описаны фармацевтические композиции для выявления специфических высокоэффективных ингибиторов ФЛА₂ [35–58] таких, как производное 2-оксоамида [24], дарапладиб [35] и другие ингибиторы [59]. В наших исследованиях, например, для выявления среди химических соединений потенциальных антипанкреатитных или антигемолитических средств в качестве индикаторов таких взаимодействий целенаправленно применялись фосфолипазы с учетом источников их получения (панкреатическая железа, яд змеи) и специфичности.

3.1. Определение физиологической активности химических соединений на фосфолиполиз.

Осуществлялся скрининг десятков тестируемых веществ, которые химически не связаны с субстратом ФЛА₂, на их способность подавлять фосфолиполиз: сначала полуколичественным методом с использованием гель-диффузии ферментов в агарозный гель, содержащий эмульсию яичного желтка [60] или эритроциты [61]. Затем среди выявленных образцов с наиболее выраженным

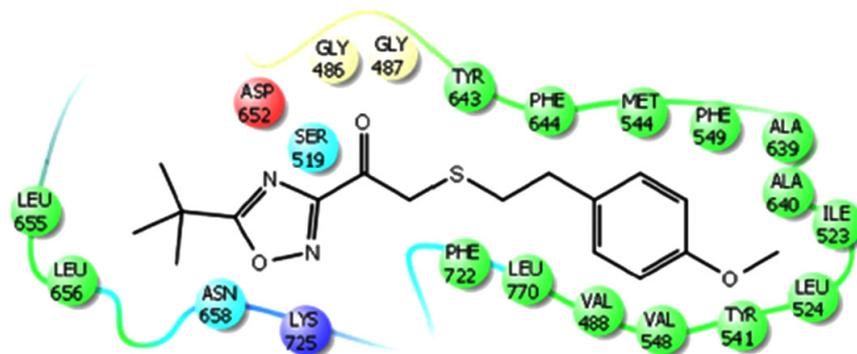


Рис. 4. Связывание ингибитора, содержащего гетероциклическое кольцо при взаимодействии с кальций-независимыми ФЛА₂ (iФЛА₂) по [1]

Fig. 4. Binding of an inhibitor containing a heterocyclic ring under interacting with calcium-independent PLA2 (iPLA2) according to [1]

ингибирующим ферменты эффектом проводили углубленное изучение их действия количественно с помощью кинетики ферментативной реакции [62, 63].

В качестве лиганда выступали низкомолекулярные биорегуляторы: производные простагландинов [64], циклогександионов, нуклеозидов, лизолипидов [65], органических кислот и др. Среди них при внесении в реактор ФЛА₂ кобры путем установления эффекта ингибирования были выявлены соединения с антигемолитической активностью – потенциальные противоядия. При внесении ФЛА₂ поджелудочной железы – потенциальные противовоспалительные соединения с предполагаемыми антипанкреатитными свойствами [66] (рис. 5).

Благодаря ингибиторному анализу в процессе изучения действия различных низкомолекулярных биорегуляторов нами установлены конкретные механизмы катализа: прямой, опосредо-

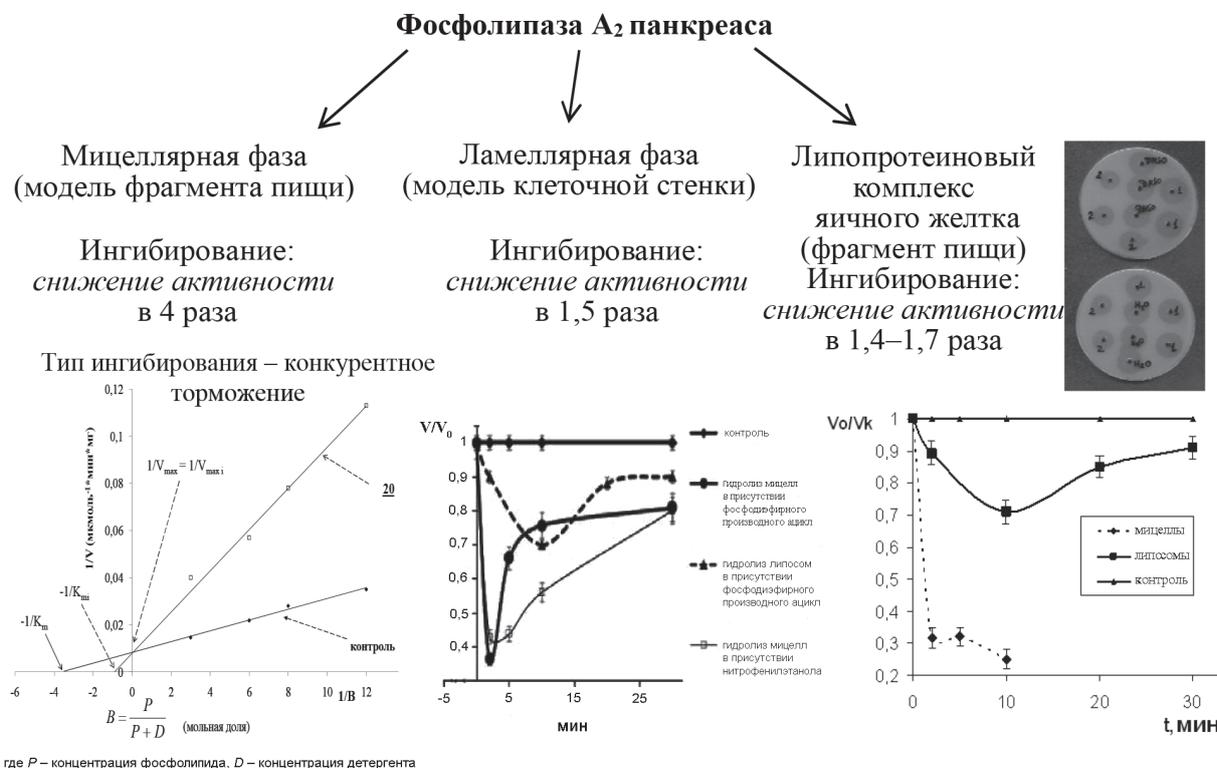


Рис. 5. Липолиз в присутствии фосфорорганических производных нуклеозидов как потенциальных антипанкреатитных средств [40]

Fig. 5. Phospholipolysis in the presence of organophosphorus derivatives of nucleosides as potential antipancreatitis agents [40]

ванной и обратной связи. Обнаружены неизвестные ранее ингибиторы фосфолиполиза среди амидов жирных кислот, 9-Ме, 10-Ме, 11-Ме аналогов простагландинов, производных тиотетровой кислоты, оксазола, 1-, 3-циклогександионов, фосфодиэфирных производных ацикловира и аденозина и др. [62, 63, 66].

3.2. Контроль безопасности пестицидов. На основе биореактора «ФЛА₂-лиганд» предложена система контроля безопасности пестицидов для пищеварительной системы. Нами показано, что при внесении ряда производных 1,3-циклогександиона в биореактор «ФЛА₂-лиганд» наблюдается снижение активности пищеварительного фермента панкреатической ФЛА₂ по отношению к одной форме организации субстрата (липосомы) и увеличение по отношению к другой (смешанные мицеллы с ДОХ) (рис. 6). Это в практическом плане очень важно, поскольку предполагает при экстраполяции на живой организм возможное ингибирование процесса фосфолиполиза при пищеварении (ФХ в мицеллярной фазе) и нежелательный гидролиз клеточных мембран кишечной стенки (ФХ в ламеллярной фазе).

На основе анализа полученных результатов в совокупности с литературными данными предложена схема (рис. 7) взаимодействия между ФЛА₂ и субстратом в мицеллярной и ламеллярной фазах при различном значении рН в присутствии эфффекторов на примере производных циклогександиона. Предположительно может идти конкуренция двух процессов: образование комплекса фермент–мицелла **1** в соответствии с моделью Денниса [40, 67, 68] и образование Шиффового основания **3** между кетогруппами циклогександиона и аминогруппами сайта распознавания поверхности (СРП) раздела фаз ФЛА₂. Промежуточной стадией между двумя конкурирующими процессами является протонирование-депротонирование аминогрупп СРП раздела фаз **2**. Исходя из предложенной схемы, возможна регуляция смещения идущих процессов в ту или иную сторону при помощи рН.

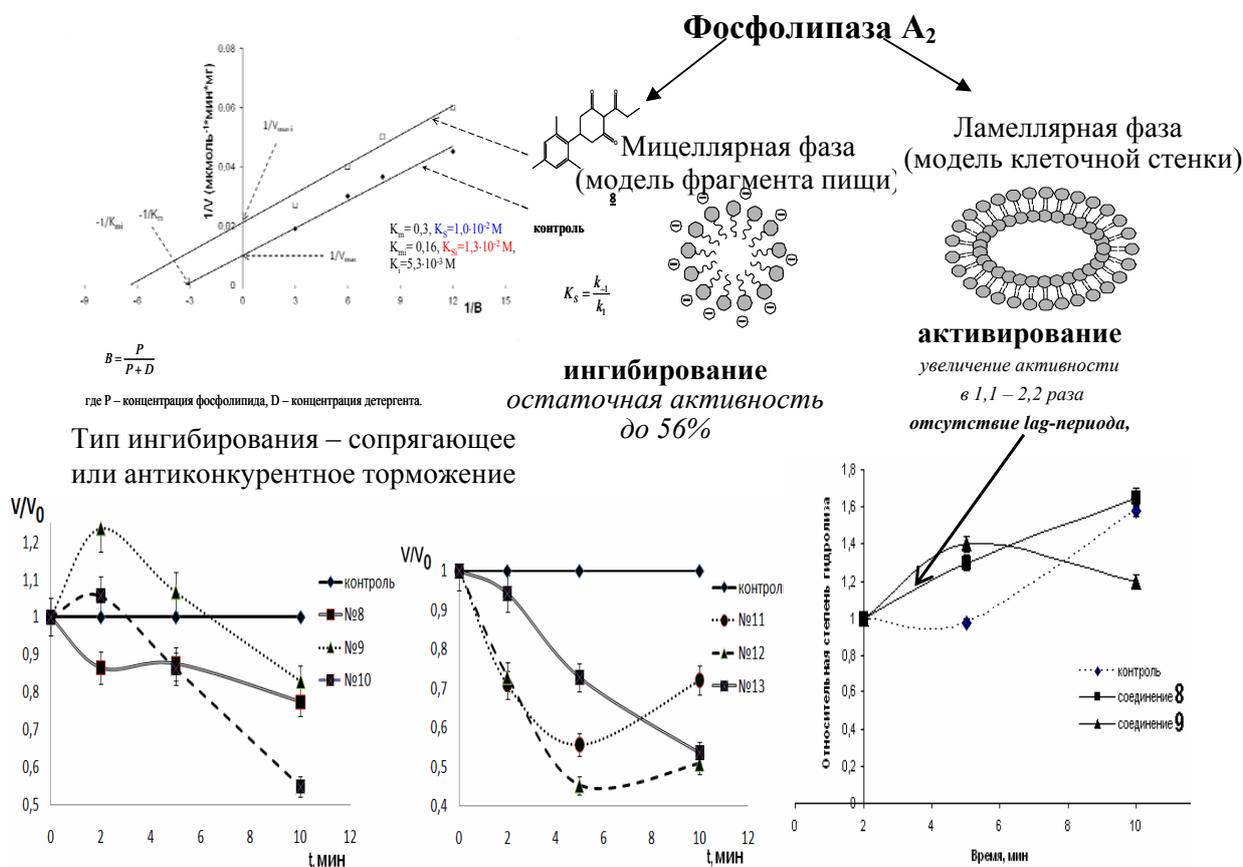


Рис. 6. Фосфолиполиз в присутствии циклогександионов [40]

Fig. 6. Phospholipolysis in the presence of cyclohexanediones [40]

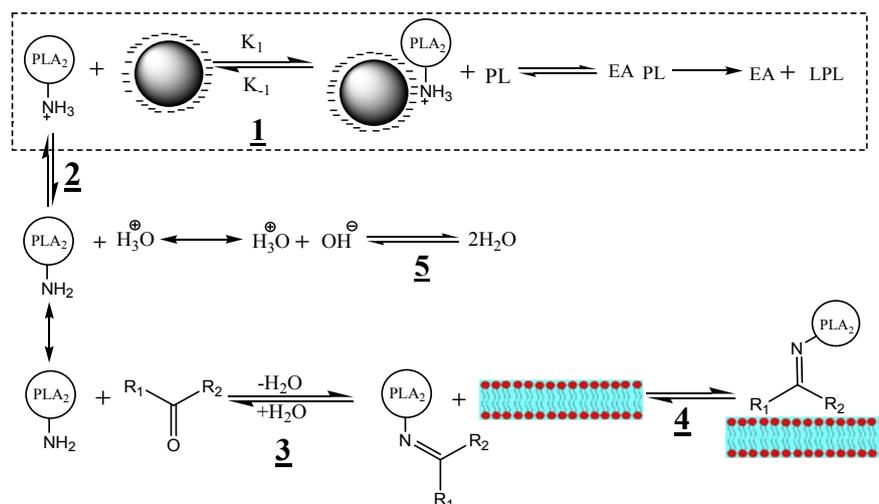


Рис. 7. Взаимодействие ФЛА₂ с субстратом в мицеллярной и ламеллярной фазах в присутствии производных 1,3 циклогександиона [40]

Fig. 7. Interaction of PLA₂ with substrate in micellar and lamellar phase in the presence of derivatives of 1,3 cyclohexandyone [40]

При высоких концентрациях производных 1,3 циклогександиона (100 мкг/мл) наблюдаемое ингибирование фосфолиполиза в мицеллярной фазе, по нашему мнению, обусловлено смещением равновесия в направлении $1 \rightarrow 2 \rightarrow 3$ с образованием Шиффовых оснований. В описанных взаимодействиях, согласно литературным данным, играют определенную роль аминогруппы сайта распознавания поверхности раздела фаз. Модификация гидрофильного СРП пестицидами, или другими соединениями (ацилирование) с приданием большей гидрофобности может изменять специфичность к надмолекулярной форме организации субстрата (равновесия $1, 4$), что подтверждается нашими экспериментами. Показано, что реакции липолиза в присутствии пестицидов циклогександионового ряда регулируются при помощи pH (равновесие 5).

3.3. Противознзимная устойчивость конъюгатов фосфолипидов с компонентами нуклеиновых кислот. Конъюгаты фосфолипидов с компонентами нуклеиновых кислот, обладающих противовирусным или противоопухолевым действием, являются новыми лекарственными формами с пониженной токсичностью и повышенной биодоступностью. Однако появляется проблема сохранения их целостности в организме при доставке к органу мишени из-за наличия в пищеварительном тракте панкреатической ФЛА₂ с высокой активностью, которая может разрушить фосфолипидную составляющую конъюгата. Поэтому возникает необходимость тестирования таких конъюгатов, как возможных субстратов для ФЛА₂ панкреаса. Это направление исследований с использованием биореактора «ФЛА₂-лиганд», предусматривающего химически связанный с субстратом лиганд, показало, что устойчивость к ферментативной деградации конъюгатов фосфолипидов с компонентами нуклеиновых кислот зависит от нуклеозидной составляющей [66].

Так, отсутствие фосфолиполиза в случае использования в качестве фосфолипазного субстрата в виде липосом конъюгата фосфатидилэтаноламина с модифицированным нуклеозидом позволило нам предложить его в качестве средства с потенциальной биологической активностью, повышающего устойчивость к действию панкреатической фосфолипазы А₂ [69]. Обнаружено, что липоконъюгат мощного противоонкологического средства клофарабин (фосфатидилклофарабин) также полностью устойчив к действию этого фермента [70], что обеспечивает его лучшую биодоступность.

3.4. Противознзимная устойчивость липосом, как контейнеров для лекарств. В отсутствие лиганда при условии использования липосом в качестве субстрата для ФЛА₂ панкреаса проведена оценка их противознзимной устойчивости в целях применения как потенциальных контейнеров для лекарств и предложены составы липосом, наименее подверженные ферментативному разрушению (рис. 8).

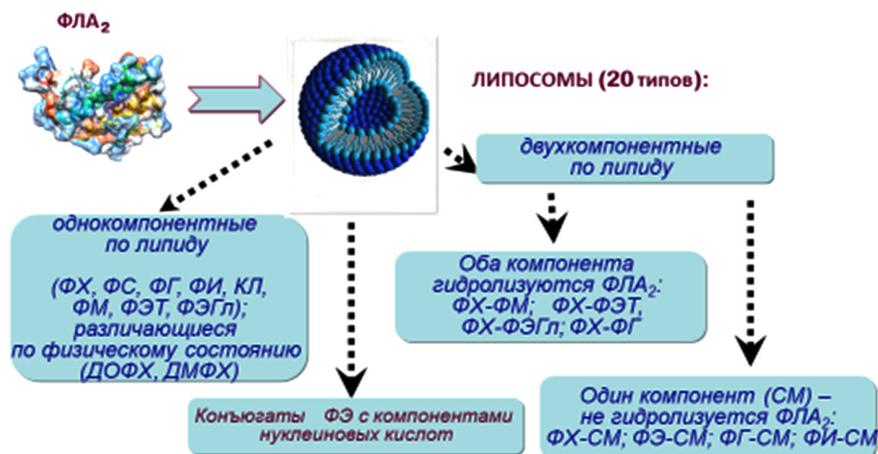


Рис. 8. Стратегия оценки устойчивости к атаке панкреатической фосфолипазой А₂ липосом, включающих фосфатидил: -холин (ФХ); -этаноламин (ФЭ); -этанол (ФЭТ); -инозит (ФИ); -глицерол (ФГ); -серин(ФС); -этиленгликоль (ФЭГл); -метанол (ФМ), а также кардиолипин (КЛ); -диолеил- (ДОФХ) и димиристоилфосфатидилхолин (ДМФХ); сфингомиелин (СМ)

Fig. 8. The strategy for assessing the resistance to attack by pancreatic phospholipase A₂ of liposomes containing phosphatidyl: -choline (PC); -ethanolamine (PE); -ethanol (PET); -inositol (PI); -glycerol (PG); -serine (PS); -ethylene glycol (PEG), -methanol (PM), as well as cardiolipin (CL); dioleoyl- (DOPC) and dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC); sphingomyelin (SM)

Наибольшую устойчивость к ферментативному разрушению, по нашим данным, проявили фосфолипиды в составе двухкомпонентных липосом со сфингомиелином. По скорости ферментативного расщепления однокомпонентных липосом наблюдается следующий ряд: ФИ = ФЭ > ФХ > ФГ. Степень гидролиза ДОФХ снижалась практически вдвое в эквимольной смеси с ДОФГ. Не желательно включение вторым компонентом в липосомы анионных фосфолипидов (ФМ, ФЭТ, ФЭГл), поскольку обнаружен их стимулирующий эффект (в соотношении 1:3 моль/моль) на деградацию цвиттер-ионного – основы липосомального контейнера [38].

3.5. Вирулентность фосфолипаз и липосомальные контейнеры. В качестве белка острой фазы ФЛА₂ группы ПА преимущественно активируется при развитии воспалительных процессов или бактериальной инвазии. ФЛА₂ группы ПА млекопитающих способны проникать в клеточную стенку бактерий. Клеточная стенка грамположительных бактерий состоит из множества слоев пептидогликана, сшитых пептидными межклеточными перемычками. Отрицательно заряженные тейхоевые и липотейхоевые кислоты прикрепляются к пептидогликану или мембране соответственно, создавая отрицательный заряд, который притягивает ФЛА₂-ПА через электростатические взаимодействия. После первоначального связывания ФЛА₂-ПА проникает в клеточную стенку для гидролиза бактериальной мембраны, содержащей фосфатидилглицерин и фосфатидилэтаноламин. Грамотрицательные бактерии обладают тонким пептидогликановым слоем, покрытым наружной мембраной, которая покрыта липополисахаридом (ЛПС). Покрытие из ЛПС препятствует внедрению ФЛА₂-ПА в клеточную стенку, значительно снижая бактерицидность действия ФЛА₂ по отношению к грамотрицательным бактериям [14]. Из-за своей способности к элиминации множественных патогенов ФЛА₂-ПА долгое время считалась антибиотикоподобным белком [71].

Однако поскольку некоторые патогены, такие как *Pseudomonas aeruginosa* и *Porphyromonas gingivalis*, продуцируют его для элиминации окружающих бактерий, полагают, что ФЛА₂-ПА микроорганизмов играет ключевую роль в дисбактериозе [72]. При этом на первый план выходит проблема устойчивости липосомальных контейнеров лекарств к микробной ФЛА₂, которая требует особого внимания и отдельного изучения в перспективе.

4. Сопряженные каскадные биореакторы, включающие два белка. Имеются единичные сообщения об использовании спаренного действия двух ферментов для определения активности фосфолипазы А₂: сначала под действием ФЛА₂ от субстрата отщепляется линолевая кислота, которая окисляется далее липоксигеназой с образованием гидроперекисного производного, что

сопровождается увеличением поглощения при 234 нм, которое измеряется спектрофотометрически [73].

Нами разработаны сопряженные каскадные биореакторы, также содержащие два белка, вступающих в действие поэтапно. Во-первых, на основе системы фосфолипаза A_2 –цитохром P450, перспективной в отношении определения безопасной для желудочно-кишечного тракта дозы антибиотиков [74]. Во-вторых, фосфолипаза A_2 –гемоглобин, использованная для создания и внедрения в клиническую практику не имеющего аналогов в мире диагностического набора «ФЛА $_2$ -ФОА» для выявления больных некротическим панкреатитом и определения общей антиоксидантной активности крови. В-третьих, фосфолипаза A_2 –миоглобин для определения общей антиоксидантной способности крови.

4.1. Биореактор на основе системы фосфолипаза A_2 –цитохром P450. Ранее нами было обнаружено с помощью кругового дихроизма наличие белок-белкового взаимодействия между цитохромом P450 и секреторными ФЛА $_2$ из различных источников [74]. Далее проведенное исследование на кинетическом уровне активности ФЛА $_2$ в условиях повышающейся концентрации цитохрома P450 (моль/моль) в присутствии и в отсутствие эконазола – антибиотика нового поколения (рис. 9) показало, что преинкубация с эконазолом цитохрома P450 3A4 человека повышает активирующее действие последнего на фосфолипазную реакцию.

Полученные данные при масштабировании могут стать основой для методики тест-системы определения *in vitro* безопасных доз антибиотиков, чтобы последние при биологически несовместимых концентрациях не модулировали фосфолиполилиз клеточной стенки кишечника.

4.2. Биореактор на основе системы фосфолипаза A_2 –гемоглобин. В литературе имеются данные об определении активности ФЛА $_2$ с использованием системы фосфолипаза A_2 –гемоглобин, которая основана на гемолизе эритроцитов под действием лизолецитина, образующегося из фосфолипидов под действием ФЛА $_2$, и последующем определении высвобождающегося при этом гемоглобина. Свободный гемоглобин измеряется либо феррицианидным методом по Нейману,

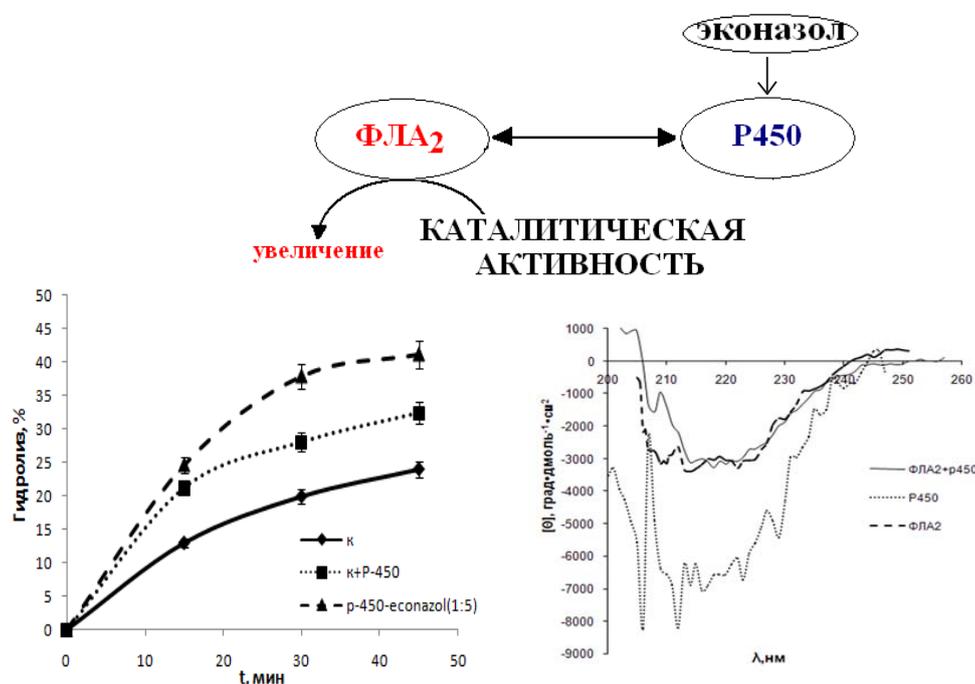


Рис. 9. Схема сопряженности биохимических процессов антибиотик ↔ цитохром P450 ↔ фосфолипаза A_2 : эконазол действует на активность ФЛА $_2$ предположительно через конформационные изменения цитохрома P450, которые влияют на взаимодействие цитохрома и фосфолипазы A_2 [74] и приводят к активации фосфолиполиза

Fig. 9. Scheme of the interconnection of biochemical processes antibiotic ↔ cytochrome P450 ↔ phospholipase A_2 : econazole affects the activity of PLA $_2$ presumably through conformational changes in cytochrome P450, which affect the interaction of cytochrome and phospholipase A_2 [74] and lead to phospholipolysis activation

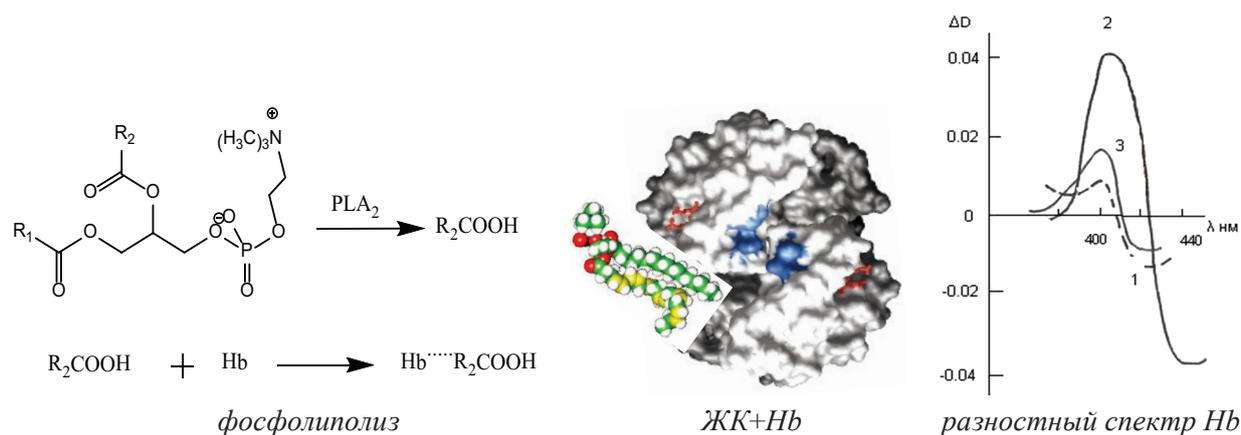


Рис. 10. Экспериментальная модель определения активности ФЛА₂ (PLA₂) в биологических жидкостях с использованием спектральных изменений гемоглобина (Hb) под действием жирной кислоты, как продукта реакции фосфолиполиза

Fig. 10. Experimental model for determining the activity of PLA₂ in biological fluids using spectral changes in hemoglobin (Hb) under the action of a fatty acid as a phospholipolysis reaction product

или используется пероксидазоподобная активность гемоглобина по изменению окраски тетраметилбензидина в присутствии перекиси водорода [24].

В нашем биореакторе в качестве индикатора фосфолиполиза используются спектральные изменения непосредственно гемоглобина под влиянием жирных кислот [75], высвобождаемых из фосфатидилхолина под действием ФЛА₂.

Сначала при взаимодействии фермента ФЛА₂ (PLA₂) с фосфолипидами (субстрат, PL) отщепляется жирная кислота (ЖК). Затем во время образования супрамолекулярного комплекса гемоглобина (Hb) с ЖК, образованной в процессе фосфолиполиза, гемопротейн превращается в окисленную низкоспиновую форму – гемихром, что выражается в развитии на третьем этапе разностного спектра, который измеряется спектрофотометрически (рис. 10).

При этом интенсивность возникающего спектра является количественным показателем активности панкреатической ФЛА₂ в сыворотке крови. Все этапы проходят в кювете спектрофотометра в одну стадию. На этой основе разработана уникальная методология определения активности ФЛА₂ в биологических жидкостях [76], а также создана не имеющая аналогов в мире соответствующая тест-система и организовано совместное с ХОП ИБОХ производство наборов реагентов ФЛА₂–ФОА для диагностики острого некротического панкреатита [77].

Эта же система в случае использования совместного УФ-облучения липидной фазы совместно с сывороткой крови позволяет определять с помощью активности ФЛА₂, обладающей антиоксидантными свойствами [78], и стандартного антиоксиданта Тролокса общую антиоксидантную активность организма [46]. Биореактор на основе системы фосфолипиды–миоглобин послужил основой для определения не энзиматическим путем общей антиоксидантной способности сыворотки крови, как более точного интегрального показателя устойчивости организма к действию активных форм кислорода [51].

Заключение. Высокая чувствительность, селективность и прямая корреляционная зависимость спектрального ответа гемопротейнов на действие жирной кислоты, как продукта фосфолиполиза под действием ФЛА₂ в представленных выше биореакторах, позволяет решать широкий круг задач, в том числе определять физиологическую активность химических соединений (биореактор «ФЛА₂–лиганд»); проводить контроль биобезопасности для желудочно-кишечного тракта пестицидов (биореактор «ФЛА₂–лиганд»); диагностировать панкреатит (биореактор «ФЛА₂–гемоглобин»); осуществлять оценку антиоксидантного потенциала организма путем определения в крови общей антиоксидантной активности (биореакторы «ФЛА₂–миоглобин», «ФЛА₂–гемоглобин») и общей антиоксидантной способности (неэнзиматический биореактор «фосфолипиды–миоглобин»). При этом в отличие от других исследователей в наших биореакторах целенаправленно использовались надмолекулярные формы субстрата ФЛА₂, характерные

для функционирования организма человека при пищеварении: смешанные мицеллы фосфолипидов с желчными кислотами и липопротеиновый комплекс яичного желтка, а также бислойные липосомы, сформированные из фосфатидилхолина, как модель клеточной стенки кишечника.

Приоритет этих направлений применения фосфолиполиза подтвержден более полутора десятков патентов, в том числе двумя патентами Евразийского патентного ведомства. Фундаментальные исследования, положенные в основу разработок указанных выше биореакторов, удостоены Государственной премии Республики Беларусь (в составе коллектива); поддержаны Фондом Сороса и рядом проектов Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований; включены в ТОП-10 (2017 г.) научных достижений Национальной академии наук Беларуси; отмечены сертификатами и свидетельствами о признании на международном уровне (Рим–2018, Дубай–2019, Сингапур–2019, Лондон–2019, Рим–2020).

Благодарность. Автор выносит благодарность всем коллегам, участвовавшим в выполнении перечисленных выше исследований. Значительный вклад в эту работу внесли ст. науч. сотрудник Скоростецкая Л. А., магистры А. Н. Мартынюк, Ю. Ш. Ермакович и Е. А. Ремеева, канд. биол. наук С. В. Кучуро, канд. хим. наук Г. Н. Антончик, канд. хим. наук Д. О. Герловский.

Acknowledgements. Author expresses her gratitude to all colleagues who participated in the implementation of the above studies. A significant contribution to this work was made by Senior Researcher L. A. Skorostetskaya, Masters A. N. Martynuk, Yu. Sh. Ermakovich and E. A. Remeeva, Ph. D. (Biology) S. V. Kuchuro, Ph. D. (Chemistry) G. N. Antonchik, Ph. D. (Chemistry) D. O. Gerlovsky.

Список использованных источников

1. Mouchlis, V. D. Phospholipase A₂ catalysis and lipid mediator lipidomics / V. D. Mouchlis, E. A. Dennis // *BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2019. – Vol. 1864, N 6. – P. 766–771 <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.08.010>
2. Kita, Y. Cytosolic phospholipase A₂ and lysophospholipid acyltransferases / Y. Kita, H. Shindou, T. Shimizu // *BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2019. – Vol. 1864, N 6. – P. 838–845. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.08.006>
3. Kono, N. Platelet-activating factor acetylhydrolases: An overview and update / N. Kono, H. Arai // *BBA – Molecular and Cell Biology of Lipid*. – 2019. – Vol. 1864, N 6. – P. 922–931. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.07.006>
4. Murakami, M. Group IID, IIE, IIF and III secreted phospholipase A₂s / M. Murakami, Y. Taketomi, K. Yamamoto // *BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2019. – Vol. 1864, N 6. – P. 803–818. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.08.014>
5. Murakami, M. Novel functions of phospholipase A₂s: Overview / M. Murakami // *BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2019. – Vol. 1864, N 6. – P. 763–765. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.02.005>
6. Hirabayashi, T. The role of PNPLA1 in ω -O-acylceramide synthesis and skin barrier function / T. Hirabayashi, M. Murakami, A. Kihara // *BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2019. – Vol. 1864, N 6. – P. 869–879. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.09.010>
7. Hui, D. Y. Group 1B phospholipase A₂ in metabolic and inflammatory disease modulation / D. Y. Hui // *BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2019. – Vol. 1864, N 6. – P. 784–788. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.07.001>
8. Function of secreted phospholipase A₂ group-X in asthma and allergic / J. D. Nolina [et al.] // *BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2019. – Vol. 1864, N 6. – P. 827–837. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.11.009>
9. Tappia, P. S. Phospholipases in Health and Disease / P. S. Tappia, N. S. Dhalla. – New York: Springer, 2014. – 410 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0464-8>
10. Samuchiwal, S. K. Harmful and protective roles of group V phospholipase A₂: Current perspectives and future directions / S. K. Samuchiwal, B. Balestrieri // *BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2019. – Vol. 1864, N 6. – P. 819–826. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.10.001>
11. Kaiser, E. Phospholipase A₂: its usefulness in laboratory diagnostics / E. Kaiser // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* – 1999. – Vol. 36, N 2. – P. 65–163. <https://doi.org/10.1080/10408369991239187>
12. Камышников, В. С. Липопротеин-ассоциированная и секреторная фосфолипазы A₂: особенности метаболического влияния и клиническая значимость / В. С. Камышников [и др.] // *Лаб. диагностика. Восточная Европа*. – 2017. – Т. 6, № 2. – С. 44–55.
13. Serum phospholipase A and prognosis in intensive care patients / R. Schaefer [et al.] // *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* – 1990. – Vol. 28, N 4. – P. 253–254.
14. Dore, E. Roles of secreted phospholipase A₂ group IIA in inflammation and hostdefense / E. Dore, E. Boilard // *BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2019. – Vol. 1864, N 6. – P. 789–802. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.08.017>
15. Способ дифференциальной диагностики вирусного гепатита и подпеченочной желтухи: а. с. 1296936 СССР / В. Н. Никифоров, М. В. Шмавонян, П. А. Казарян, А. Л. Мхитарян, Д. С. Волян. – Оpubл. 15.03.87.
16. Light-generating methods using dioxyethanes activated by anchimeric cleavage: Patent no. 5248618 USA / A. Haces. – Publ. date 28.09.1993.

17. Degradation of annexin I in bronchoalveolar lavage fluid in patients with cystic fibrosis / F. H. C. Tsao [et al.] // *Am. J Respir. Cell. Mol. Biol.* – 1998. – Vol.18, N 1. – P. 120–128. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.18.1.2808>
18. Diagnostic test for the detection of type IV cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂): UK Patent GB19990005417 / A. C. A. Glen, D. J. McDonald. – Publ. date: 27.02.2004.
19. Nevalainen, T. J. Serum phospholipases A₂ in inflammatory diseases / T. J. Nevalainen // *Clin. Chem.* – 1993. – Vol. 39, no. 12. – P. 2453–2459. <https://doi.org/10.1093/clinchem/39.12.2453>
20. Nevalainen, T. The role of phospholipase A₂ in acute pancreatitis / T. Nevalainen // *Z. Med. Lab. Diagn.* – 1989. – Vol. 30, N 6. – P. 299–303.
21. Application of a new monoclonal antibody for time-resolved fluoroimmunoassay of human pancreatic phospholipase A₂ / S. A. Santavuori [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 1991. – Vol. 29, N 12. – P. 819–826. <https://doi.org/10.1515/cclm.1991.29.12.819>
22. Фосфолипазы плазмы крови при ожоговом шоке / Т. Л. Заец [и др.] // *Бюлл. эксп. биол. мед.* – 1987. – Т. 103. – С. 403–404.
23. Makela, A. Serum phospholipase A₂, amylase, lipase, and urinary amylase activities in relation to the severity of acute pancreatitis / A. Makela, T. Kuusi, T. Schroder // *Eur. J. Surg.* – 1997. – Vol. 163, N 12. – P. 915–922.
24. Photometric test to measure the enzymatic activity of pancreatic phospholipase A₂ to distinguish between mild and severe (necrotizing) forms of acute pancreatitis in serum or plasma: DE Patent № DE19530410.1 / U. Helfrich. – Publ. date 20.02.1997.
25. Measurement of Phospholipase A₂ Polypeptide in Tissue Cells: Patent 5747264 USA / C. J. Schmidt, F. Tobin, F. E. Wilkinson. – Publ. date 05.05.1998.
26. Human phospholipase activating protein and methods for diagnosis of rheumatoid arthritis: Patent № US 626589 / J. Bomalaski, S. Clark, M. A. Shorr, Robert G. L.; applicant and patent holder J. Bomalaski, S. Clark, M. A. Shorr, G. L. Robert. – Publ. date 25.06.92.
27. PLA₂ activity as a marker for ovarian and other gynecologic cancers: Patent USA №US20130045947 / Yan Xu. – Publ. date 21.02.2013.
28. Method for evaluating blood-neural barrier permeability: US Patent no. 8349577 / Kh. Iqbal, S. Chalbot, I.Grundke-Iqbal. – Publ. date 08.01.2013.
29. Methods for detecting Lp-PLA₂ activity and inhibition of Lp-PLA₂ activity / Yaping Shou, Yin-Fai Siu, George T. Walker. – Publ. date 01.11. 2012.
30. Methods for detecting Lp-PLA₂ activity and inhibition of Lp-PLA₂ activity: US Patent no. US8846309B2 / Yaping Shou, Yin-Fai Siu, George T. Walker. – Publ. date 30.09. 2014.
31. Methods for detecting Lp-PLA₂ activity and inhibition of Lp-PLA₂ activity: US Patent no. US20150017671 / Yaping Shou, Yin-Fai Siu, George T. Walker. – Publ. date 15.01. 2015.
32. Methods for detecting Lp-PLA₂ activity and inhibition of Lp-PLA₂ activity: US Patent no. US20150247858 / Yaping Shou, Yin-Fai Siu, George T. Walker. – Publ. date 03.09. 2015.
33. Methods of detecting Lp-PLA₂ activity: Patent no. WO2005074604A2 / Xiaozhu Duan, Nam Kim, Robert L. Wolfert. – Publ. date 18.08.2005.
34. Phospholipid oxidation and Lp-PLA₂ as predictors of coronary artery disease. Patent US20090317819/ SotiriosTsimikas, JosephWitztum. – Publ. date 24.12.2009.
35. Compositions and methods for inhibition of phospholipase A₂ mediated inflammation. Patent no. WO2003076389A1/ E. Dennis, T. Yaksh, K. Killermann Lucas, C. Svensson, D. A. Six, G. Kokotos, V. Constantinou-Kokotou. – Publ. date 18.09.2003.
36. Single-photon emission computed tomography Positron Emission Tomography (PET): Patentno. 2019063634 USA / O. Melina, E. Jestin, F. Guibbal, S. Benard. – Publ. date 4.04.2019.
37. Литвінко, Н. М. Прикладная энзимология фосфатацилгидролаз в изучении взаимосвязи структура-функция в ряду биополимеров и низкомолекулярных биорегуляторов / Н. М. Литвінко // *Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук.* – 2017. – № 3. – С. 115–128.
38. Литвінко, Н. М. Активность фосфолипаз A₂ и C при биохимическом моделировании / Н. М. Литвінко. – Минск: Технопринт, 2003. – 350 с.
39. Литвінко, Н. М. Межфазный катализ липолитических реакций в биорганической химии: особенности и практическое применение / Н. М. Литвінко // *Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук.* – 2015. – № 4. – С. 109–121.
40. Герловский, Д. О. Активность панкреатической фосфолипазы A₂ в присутствии ряда производных 1,3-циклогександиона и некоторых органофосфатов: дис. ... канд. хим. наук: 03.01.04 /Д. О. Герловский. – Минск, 2012. – 194 с.
41. Брокерхофф, Х. Липолитические ферменты / Х. Брокерхофф, Р. Дженсен. – М.: Мир, 1978. – 330 с
42. Litvinko, N. M. Hydrolysis of glycerophospholipids by the phosphatidylinositol-specific phospholipase // *Biophosphates and Their Analogous – Synthesis, Structure, Metabolism and Activity* / N. M. Litvinko. – Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1987. – P. 315–320.
43. Litvinko, N. M. Phospholipolysis: research and new approaches to practical use / N. M. Litvinko // *Abstr. of International Conf. Innovations in Food Science and Human Nutrition (IFHN-2018), 13–15 September 2018.* – Rome, Italy, 2018. – P. 59.
44. Litvinko, N. M. Diagnostic biosystems based on phosphatideacylhydrolases and hemoproteins / N. M. Litvinko, L. A. Skorostetskaya, D. O. Gerlovsky // *Frontiers in Life Sciences. Signaling and Metabolism, 1st Belarussian-Polish-Lithuanian Conf., 8–9 November 2018.* – Grodno, 2018. – P. 209–210.

45. Новые инновационные технологии клинко-биохимического исследования как фундаментальная основа лабораторной медицины и дальнейшего становления экономики знаний / В. С. Камышников [и др.] // Инновационные технологии в медицине. – 2018. – Т. 6, № 1. – С. 72–82.
46. Litvinko, N. M. The interaction of phospholipase A₂ with oxidized phospholipids at the lipid-water surface with different structural organization / N. M. Litvinko, L. A. Skorostetskaya, D. O. Gerlovsky // *Chemistry and Physics of Lipids*. – 2018. – Vol. 211. – P. 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.10.010>
47. Litvinko, N. M. A new approach toward the application of biochemical systems based on phospholipolysis / N. M. Litvinko, L. A. Skorostetskaya, D. O. Gerlovsky // *Current Research in Bioorganic and Organic Chemistry*. – 2019. – Vol. 3. – P. 19.
48. Differential Spectroscopy in Studying of the Phospholipolysis: Results and New Approaches to Practical Use as Enzyme Therapy and Diagnostics / N. M. Litvinko [et al.] // *Proceedings of BIT's 7th Annual Conference of AnalytiX-2019, Singapore, 12–15 April 2019*. – P. 59.
49. Phosphatideacylhydrolases: priority role in digestion and a new application for the detection of pancreatitis / N. M. Litvinko [et al.] // *Abstr. 2 nd conference on innovations in food science& human nutrition. 12–14 Sep, 2019*. – London, 2019. – P. 55.
50. Диагностические биосистемы на основе фосфатацилгидролаз и гемопротеинов // Н. М. Литвинко [и др.] // *Биохимия и молекулярная биология: сб. науч. тр. – Минск: ИВЦ Минфина, 2019. – Вып. 3. Механизмы регуляции процессов жизнедеятельности в норме и патологии. – С. 34–39.*
51. Эффект УФ-облученных жирных кислот на спектральные свойства миоглобина / Н. М. Литвинко [и др.] // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2019. – Т. 63. № 1. – С. 44–54.*
52. Computer-aided drug design guided by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry: A powerful combination for the development of potent and selective inhibitors of Group VIA calcium-independent phospholipase A₂ / V. D. Mouchlis [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 24. – P. 4801–4811. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.05.009>
53. Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention / J. Cao [et al.] // *Chem. Rev.* – 2011. – Vol. 111, no. 10. – P. 6130–6185. <https://doi.org/10.1021/cr200085w>
54. Small-molecule inhibitors as potential therapeutics and as tools to understand the role of phospholipases A₂ / A. Nikolaou [et al.] // *BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2019. – Vol. 1864, N 6. – P. 941–956. <http://doi:10.1016/j.bbailip.2018.08.009>
55. Mouchlis, V. D. Design of new secreted phospholipase A₂ inhibitors based on docking calculations by modifying the pharmacophore segments of the FPL67047XX inhibitor / V. D. Mouchlis, T. M. Mavromoustakos, G. Kokotos // *J. Comput.-Aided Mol. Des.* – 2010. – Vol. 24, N 2. – P. 107–115. <https://doi.org/10.1007/s10822-010-9319-7>
56. Potent and selective fluoroketone inhibitors of group VIA calcium-independent phospholipase A₂ / G. Kokotos [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 53, N 9. – P. 3602–3610. <https://doi.org/10.1021/jm901872v>
57. Development of potent and selective inhibitors for group VIA calcium-independent phospholipase A₂ guided by molecular dynamics and structure-activity relationships / D. Mouchlis [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 59, no. 9. – P. 4403–4414. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00377>
58. Phospholipase inhibitors: US Patent no. 2003153751 USA / J. S. Seehra, N. Kaila, J. S. Mckew, F. Lovering, J. E. Bemis, Y. Xiang. – Publ. date 14.08.2003.
59. Inhibition of secretory phospholipase A₂. 1-Design, synthesis and structure-activity relationship studies starting from 4-tetradecyloxybenzamidinone to obtain specific inhibitors of group II sPLA₂s/ L. Assogbaa [et al.] // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2005. – Vol. 40, N 9. – P. 850–861. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2005.03.027>
60. Способ определения эффекторных свойств физиологически активных соединений: патент BY №5752 / Н. М. Литвинко, С. В. Кучуро, Т. А. Желдакова, Е. Р. Филич. – Оpubл. 30.12.2003
61. Способ определения антигемолитической активности химического соединения: патент BY №10604 / Н. М. Литвинко, С. В. Кучуро, Г. Н. Рахуба, Д. Б. Рубинов, Т. А. Желдакова. – Оpubл. 30.06.2008
62. 3,5-дизамещенные производные тиотетрановой кислоты, проявляющие антифосфолипазную активность антипанкреатического профиля действия, и способ их получения: патент BY №10191 / Д. Б. Рубинов, Т. А. Желдакова, Н. М. Литвинко, С. В. Кучуро, Г. Н. Рахуба. – Оpubл. 28.02.2008.
63. Производные β-трикетонов тиофенового ряда, проявляющие антифосфолипазную активность антигемолитического профиля действия: патент BY №10192 / Д. Б. Рубинов, Т. А. Желдакова, Н. М. Литвинко, С. В. Кучуро, Г. Н. Рахуба. – Оpubл. 28.02.2008.
64. Кучуро, С. В. Механизмы взаимодействия фосфолипазы A₂, простагландинов и этанола в регуляции липолиза в биологических мембранах: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04 / С. В. Кучуро. – Минск, 2001. – 130 с.
65. Рахуба, Г. Н. Липолитические реакции с участием фосфолипаз A₂ и механизмы их регуляции по принципу обратной связи: дис. ... канд. хим. наук: 03.00.04 / Г. Н. Рахуба. – Минск, 2007. – 143 с.
66. Фосфодизфирные производные ацикловира – новые ингибиторы панкреатической фосфолипазы A₂ / Д. О. Герловский [и др.] // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2010. – Т. 54, № 1. – С. 75–82.*
67. Deems, R. A. Kinetic analysis of phospholipase A₂ activity toward mixed micelles and its implications for the study of lipolytic enzymes / R. A. Deems, B. R. Eaton, E. A. Dennis // *J. Biol. Chem.* – 1975. – Vol. 250, N 23. – P. 9013–9020.
68. Hendrickson, H. S. Analysis of the kinetics of phospholipid activation of cobra venom phospholipase A₂ / H. S. Hendrickson, E. A. Dennis // *J. Biol. Chem.* – 1984. – Vol. 259, N 9. – P. 5740–5744.
69. Конъюгат фосфолипида с модифицированным нуклеозидом, фармацевтическая композиция и средство, повышающее устойчивость к действию панкреатической фосфолипазы A₂: Патент BY №11905 / Н. М. Литвинко, Е. Н. Калиниченко, Е. В. Жерносек, С. В. Кучуро. – Оpubл. 28.02.2008.

70. The enzymatic synthesis of Phospholipide-Nucleoside conjugates and study of their substrate activity for the digestive phospholipase A₂ / N. M. Litvinko [et al.] // *Journal of Nanotechnology: Nanomedicine & Nanobiotechnology*. – 2020. – Vol. 7. – P. 55–56.
71. Type-IIA secreted phospholipase A₂ is an endogenous antibiotic-like protein of the host / Y. Wu [et al.] // *Biochimie*. – 2010. – Vol. 92. – P. 583–587. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.01>
72. Activation of Notch-1 in oral epithelial cells by *P. gingivalis* triggers the expression of the antimicrobial protein PLA₂-IIA / A. Al-Attar [et al.] // *Mucosal Immunol.* – 2018. – Vol. 11, N 4. – P. 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0014-7>
73. Jimenez, M. A continuous spectrophotometric assay for phospholipase A(2) activity / M. Jimenez // *Anal. Biochem.* – 2003. – Vol. 319. – P. 131–137.
74. Особенности взаимодействия цитохрома P450 и фосфолипаз A₂ разной специфичности, обнаруживаемые КД-спектроскопией / Н. М. Литвинко [и др.] // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси*. – 2016. – Т. 60, № 6. – С. 64–71.
75. Супрамолекулярный комплекс жирной кислоты с гемоглобином как индикатор фосфолиполиза для выявления экспериментального панкреатита / Н. М. Литвинко [и др.] // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси*. – 2016. – Т. 60, № 4. – С. 82–88.
76. Способ определения активности фосфолипазы A₂ в сыворотке крови: патент ВУ № 12552 / Н. М. Литвинко, Л. А. Скоростецкая, С. В. Кучуро, Г. Н. Рахуба. – Оpubл. 30.06.2009.
77. Способ диагностики панкреатита по уровню A₂ фосфолипазной активности сыворотки крови: патент ВУ №13143 / Н. М. Литвинко, Л. А. Скоростецкая. – Оpubл. 30.04.2010.
78. Булакова, Е. Б. Биоантиоксиданты / Е. Б. Булакова // *Рос. хим. журн.* – 2007. – Т. LI, № 1. – С. 3–12.

References

1. Mouchlis V. D., Dennis E. A. Phospholipase A₂ catalysis and lipid mediator lipidomics. *BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2019, vol. 1864, no 6, pp. 766–771. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.08.010>
2. Kita Y., Shindou H., Shimizu T. Cytosolic phospholipase A₂ and lysophospholipid acyltransferases. *BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2019, vol. 1864, no. 6, pp. 838–845. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.08.006>
3. Kono N., Arai, H. Platelet-activating factor acetylhydrolases: An overview and update. *BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2019, vol. 1864, no. 6, pp. 922–931. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.07.006>
4. Murakami M., Miki Y., Sato H., Murase R., Taketomi Y., Yamamoto K. Group IID, IIE, IIF and III secreted phospholipase A₂s. *BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2019, vol. 1864, no. 6, pp. 803–818. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.08.014>
5. Murakami M. Novel functions of phospholipase A₂s: Overview. *BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2019, 2019, vol. 1864, no. 6, pp. 763–765. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.02.005>
6. Hirabayashi T., Murakami M. Kihara A. The role of PNPLA1 in ω-O-acylceramide synthesis and skin barrier function. *BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2019, vol. 1864, no. 6, pp. 869–879. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.09.010>
7. Hui D. Y. Group IB phospholipase A₂ in metabolic and inflammatory disease modulation. *BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2019, vol. 1864, no. 6, pp. 784–788. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.07.001>
8. Nolina J. D., Murphy R. C., Gelbb M. H., Altemeiera W.A., Henderson W. R. Jr., Hallstrand T. S. Function of secreted phospholipase A₂ group-X in asthma and allergic. *BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2019, vol. 1864, no. 6, pp. 827–837. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.11.009>
9. Tappia P. S., Dhalla N. S. *Phospholipases in Health and Disease*. New York: Springer, 2014, 410 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0464-8>
10. Samuchiwal S. K., Balestrieri B. Harmful and protective roles of group V phospholipase A₂: Current perspectives and future directions. *BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2019, vol. 1864, no. 6, pp. 819–826. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.10.001>
11. Kaiser E. Phospholipase A₂: its usefulness in laboratory diagnostics // *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 1999, vol. 36, no. 2, pp. 65–163. <https://doi.org/10.1080/10408369991239187>
12. Kamyshnikov V., Litvinko N., Pekhtereva N., Yakovlev-Malykh N., Yuraga T. Lipoprotein-associated and secretory phospholipase A₂: features of metabolic influence and clinical significance of research. *Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa=Laboratory diagnostics. Eastern Europe*, 2017, vol. 6, no. 2, pp. 44–55 (in Russian).
13. Schaefer R., Teschner M., Penzel W., Habscheid W., Heidland A., Hoffmann G. E. Serum phospholipase A and prognosis in intensive care patients. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical biochemistry*, 1990. vol. 28, no. 4, pp. 253–254.
14. Dore E., Boilard E. Roles of secreted phospholipase A₂ group IIA in inflammation and host defense. *BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2019, vol. 1864, no. 6, pp. 789–802. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.08.017>
15. Nikiforov V. N., Shmavonyan M. V., Kazaryan P. A., Mkhitarian A. L., Vopyan D. S. *Method of differential diagnosis of viral hepatitis and subhepatic jaundice*. Author's certificate 1296936 USSR. Publ. date 15.03.1987 (in Russian).
16. Haces A. *Light-generating methods using dioxethanes activated by anchimeric cleavage*. Patent no. 5248618 USA. Publ. date 28.09.1993.
17. Tsao F. H. C., Meyer K. C., Chen X., Rosenthal N. S., Hu J. Degradation of annexin I in bronchoalveolar lavage fluid in patients with cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 1998, vol. 18, no. 1, pp. 120–128. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.18.1.2808>
18. Glen A. C. A., McDonald D. J. *Diagnostic test for the detection of type IV cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂)*. UK Patent GB19990005417. Publ. date 27.02.2004.

19. Nevalainen T. J. Serum phospholipases A₂ in inflammatory diseases. *Clinical Chemistry*, 1993, vol. 39, no. 12, pp. 2453–2459. <https://doi.org/10.1093/clinchem/39.12.2453>
20. Nevalainen T. The role of phospholipase A₂ in acute pancreatitis. *Zeitschrift für medizinische Laboratoriums diagnostik*, 1989, vol. 30, no. 6, pp. 299–303.
21. Santavuori S. A., Korteso P. T., Eskola J. U., Nevalainen T. J. Application of a new monoclonal antibody for time-resolved fluoroimmunoassay of human pancreatic phospholipase A₂. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 1991, vol. 29, no. 12, pp. 819–826. <https://doi.org/10.1515/cclm.1991.29.12.819>
22. Zayets T.L., Lavrov V.A., Marchuk A.I., Nosova I. M. Phospholipases of blood plasma in burn shock. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 1987, vol. 103, pp. 403–404 (in Russian).
23. Makela A. Kuusi T., Schroder T. Serum phospholipase A₂, amylase, lipase, and urinary amylase activities in relation to the severity of acute pancreatitis. *European journal of surgery*, 1997, vol. 163, no. 12, pp. 915–922.
24. Helfrich U. *Photometric test to measure the enzymatic activity of pancreatic phospholipase A₂ to distinguish between mild and severe (necrotizing) forms of acute pancreatitis in serum or plasma*. DE Patent № DE19530410.1. Publ. date 20.02.1997.
25. Schmidt C. J., Tobin F., Wilkinson F. E. Measurement of Phospholipase A₂ Polypeptide in Tissue Cells. US Patent no. 5747264. Publ. date 05.05.1998.
26. Bomalaski J., Clark S., Shorr M. A., Robert G. L.; applicant and patent holder Bomalaski J., Clark S., Shorr M. A., Robert G. L. *Human phospholipase activating protein and methods for diagnosis of rheumatoid arthritis*. Patent № US 626589. Publ. date 25.06.92.
27. Yan Xu. *PLA-2 activity as a marker for ovarian and other gynecologic cancers*. Patent no. US20130045947. Publ. date 21.02.2013.
28. Iqbal Kh., Chalbot S., Grundke-Iqbal I. *Method for evaluating blood-neural barrier permeability*. US Patent no. 8349577. Publ. date 08.01.2013.
29. Yaping Shou, Yin-Fai Siu, George T. Walker. *Methods for detecting Lp-PLA₂ activity and inhibition of Lp-PLA₂ activity*. US Patentno. US20120276569. Publ. date 01.11. 2012.
30. Yaping Shou, Yin-Fai Siu, George T. Walker. *Methods for detecting Lp-PLA₂ activity and inhibition of Lp-PLA₂ activity*. US Patent no. US8846309B2. Publ. date 30.09. 2014.
31. Yaping Shou, Yin-Fai Siu, George T. Walker. *Methods for detecting Lp-PLA₂ activity and inhibition of Lp-PLA₂ activity*. US Patent no. US20150017671. Publ. date 15.01. 2015.
32. Yaping Shou, Yin-Fai Siu, George T. Walker. *Methods for detecting Lp-PLA₂ activity and inhibition of Lp-PLA₂ activity*. US Patent no US20150247858. Publ. date 03.09. 2015.
33. Xiaozhu Duan, Nam Kim, Robert L Wolfert. *Methods of detecting Lp-PLA₂ activity*. Patentno. WO2005074604 A2. Publ. date. 18.08.2005.
34. Sotirios Tsimikas, Joseph Witztum. Phospholipid oxidation and LP-PLA₂ as predictors of coronary artery disease. Patent no. US20090317819. Publ. date 24.12.2009.
35. Dennis E., Yaksh T., Killermann Lucas K., Svensson C., Six D. A., Kokotos G., Constantinou-Kokotou V. *Compositions and methods for inhibition of phospholipase A₂ mediated inflammation*. Patent no. WO2003076389A1. Publ. date 18.09.2003.
36. Melina O., Jestin E., Guibbal F., Benard S. *Single-photon emission computed tomography Positron Emission Tomography (PET)*. US Patent no. 2019063634. Publ. date 04.04.2019.
37. 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'nai 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).
38. Litvinko N. M. Activity of phospholipases A₂ and C in biochemical modeling. Minsk, Technoprint Publ., 2003. 350 p. (in Russian).
39. Litvinko N. M. Interphase catalysis of lipolytic reactions in bioorganic chemistry: features and practical application. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2015, no. 4, pp. 109–121 (in Russian).
40. Gerlovsky D. O. *Activity of pancreatic phospholipase A₂ in the presence of a number of 1,3-cyclohexanedione derivatives and some organophosphates*. Minsk, 2012. 194 p. (in Russian).
41. Brockerhoff H., Jensen R. *Lipolytic enzymes*. Academic Press, Inc. 1974.
42. Litvinko N. M. Hydrolysis of glycerophospholipids by the phosphatidylinosite-specific phospholipase. *Biophosphates and Their Analogous – Synthesis, Structure, Metabolism and Activity*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1987, pp. 315–320.
43. Litvinko N. M. Phospholipolysis: research and new approaches to practical use. *Abstr. of International Conf. Innovations in Food Science and Human Nutrition (IFHN-2018)*, 13–15 September 2018, Rome, Italy, pp. 59.
44. Litvinko N. M., Skorostetskaya L. A., Gerlovsky D. O. Diagnostic biosystems based on phosphatideacylhydrolases and hemoproteins *Frontiers in Life Sciences. Signaling and Metabolism. 1st Belarussian–Polish–Lithuanian. Conf., 8–9 November 2018. Grodno*, 2018, pp. 209–210.
45. Kamyshnikov V. S., Kiselev P. A., Litvinko N. M., Vorobey A. V., Skorostetskaya L. A., Juraha T. M. New innovative technologies of clinical and biochemical research as a fundamental basis of translational laboratory medicine and further development of the “knowledge-based economy”. *Innovatsionnye tekhnologii v meditsine = Innovative Technologies in Medicine*, 2018, vol. 6, no. 1, pp. 72–82 (in Russian).

46. Litvinko N. M., Skorostetskaya L. A., Gerlovsky D. O. The interaction of phospholipase A₂ with oxidized phospholipids at the lipid-water surface with different structural organization. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2018, vol. 211, pp. 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.10.010>
47. Litvinko N. M., Skorostetskaya L. A., Gerlovsky D. O. A new approach toward the application of biochemical systems based on phospholipolysis. *Current Research in Bioorganic and Organic Chemistry*, 2019, vol. 3, pp. 19.
48. Litvinko N. M., Yermakovich Yu. Sh., Skorostetskaya L. A., Gerlovsky D. O. Differential Spectroscopy in Studying of the Phospholipolysis: Results and New Approaches to Practical Use as Enzyme Therapy and Diagnostics. *Proceedings of BIT's 7th Annual Conference of AnalytiX-2019*, Singapore, 12–15 April 2019, pp. 59.
49. Litvinko N. M., Skorostetskaya L. A., Gerlovsky D. O., Kamyshnikov V. S. Phosphatidacylhydrolases: priority role in digestion and a new application for the detection of pancreatitis. *Abstr. 2nd conference on innovations in food science & human nutrition, Sep. 12–14, 2019*, London, 2019, pp. 55.
50. Litvinko N. M., Skorostetskaya L. A., Ermakovich Yu. Sh., Gerlovsky D. O. *Diagnostic biosystems based on phosphatidacylhydrolases and hemoproteins. Biokhimiya i molekulyarnaya biologiya: sb. nauch. tr.* [Biochemistry and Molecular Biology. Collection of proceedings]. Minsk, DCCof the Ministry of Finance, 2019, vol. 3. Mechanisms of regulation of vital processes in health and disease, pp. 34–39 (in Russian).
51. Litvinko N. M., Skorostetskaya L. A., Gerlovsky D. O., Ermakovich Yu. Sh., Evdokimova G. S. Effect of UV-irradiated fatty acids on the spectral properties of myoglobin. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2019, vol. 63, no. 1, pp. 44–54 (in Russian).
52. Mouchlis V. D., Morisseau C., Hammock B. D., Li S., McCammon J. A., Dennis E. A. Computer-aided drug design guided by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry: A powerful combination for the development of potent and selective inhibitors of Group VIA calcium-independent phospholipase A₂. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2016, vol. 24, no. 20, pp. 4801–4811. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.05.009>
53. Dennis E., Cao J., Hsu Y.-H., Magrioti V., Kokotos G. Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chemical Reviews*, 2011, vol. 111, no. 10, pp. 6130–6185. <https://doi.org/10.1021/cr200085w>
54. Nikolaou A., Kokotou M. G., Vasilakaki S., Kokotos G. Small-molecule inhibitors as potential therapeutics and as tools to understand the role of phospholipases A₂. *BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2019, vol. 1864, no. 6, pp. 941–956. <http://doi:10.1016/j.bbalip.2018.08.009>
55. Mouchlis V. D., Mavromoustakos T. M., Kokotos G. Design of new secreted phospholipase A₂ inhibitors based on docking calculations by modifying the pharmacophore segments of the FPL67047XX inhibitor. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 2010, vol. 24, no. 2, pp. 107–115. <https://doi.org/10.1007/s10822-010-9319-7>
56. Kokotos G., Hsu Y.-H., Burke J., Baskakis C., Kokotos C., Magrioti V., Dennis E. Potent and selective fluoroketone inhibitors of group VIA calcium-independent phospholipase A₂. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, vol. 53, no. 9, pp. 3602–3610. <https://doi.org/10.1021/jm901872v>
57. Mouchlis V. D., Limnios M. G., Kokotou E., Barbayianni G., Kokotos J. A., McCammon E. A., Dennis. Development of potent and selective inhibitors for group VIA calcium-independent phospholipase A₂ guided by molecular dynamics and structure-activity relationships. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, vol. 59, no. 9, pp. 4403–4414. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00377>
58. Seehra J. S., Kaila N., Mckew J. S., Lovering F., Bemis J. E., Xiang Y. *Phospholipase inhibitors*. US Patent no. 2003153751 USA. Publ. date 14.08.2003.
59. Assogbaa L., Ahamada-Himidia A., Meddad-Bel Habicha N., D. Aouna D., Boukha L., Massicota, F., Mounier C. M., Hueta J., Lamouri A., Ombetta J.-E., Godfroid J.-J., Donga, C.-Z., Heymans F. Inhibition of secretory phospholipase A₂. 1-Design, synthesis and structure-activity relationship studies starting from 4-tetradecyloxybenzamide to obtain specific inhibitors of group II sPLA₂s. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2005, vol. 40, no. 9, pp. 850–861. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2005.03.027>
60. Litvinko N. M., Kuchuro S. V., Zheldakova T. A., Filich E. R. *Method for determining the effector properties of physiologically active compounds*. Patent BY no. 5752. Publ. date 30.12.2003 (in Russian).
61. Litvinko N. M., Kuchuro S. V., Rakhuba G. N., Rubinov D. B., Zheldakova T. A. *Method for determining the anti-hemolytic activity of a chemical compound*. Patent BY no. 10604. Publ. date 30.06.2008 (in Russian).
62. Rubinov D. B., Zheldakova T. A., Litvinko N. M., Kuchuro S. V., Rakhuba G. N. *3,5-isubstituted thiotetronic acid derivatives exhibiting antiphospholipase activity with an antipancreatic profile of action, and a method for their preparation*. Patent BY no. 10191. Publ. date 28.02.2008 (in Russian).
63. Rubinov D. B., Zheldakova T. A., Litvinko N. M., Kuchuro S. V., Rakhuba G. N. *Derivatives of β-triketones of the thiophene series, exhibiting antiphospholipase activity of the anti-hemolytic action profile*. Patent BY №10192. Publ. date 28.02.2008 (in Russian).
64. Kuchuro S. V. *Mechanisms of interaction of phospholipase A₂, prostaglandins and ethanol in the regulation of lipolysis in biological membranes*. Minsk, 2001. 130 p. (in Russian).
65. Rakhuba G. N. *Lipolytic reactions involving phospholipases A₂ and mechanisms of their regulation according to the principle of feedback*. Minsk, 2007. 143 p. (in Russian).
66. Gerlovsky D. O., Litvinko N. M., Skorostetskaya L. A., Kuchuro S. V., Kalinichenko E. N., Farina A. V. Phosphodiesterases of acyclovir – new inhibitors of pancreatic phospholipase A₂. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2010, vol. 54, no. 1, pp. 75–82 (in Russian).
67. Deems R. A., Eaton B. R., Dennis E. A. Kinetic analysis of phospholipase A₂ activity toward mixed micelles and its implications for the study of lipolytic enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 1975, vol. 250, no. 23, pp. 9013–9020.

68. Hendrickson H. S., Dennis E. A. Analysis of the kinetics of phospholipid activation of cobra venom phospholipase A_2 . *Journal of Biological Chemistry*, 1984, vol. 259, no. 9, pp. 5740–5744.

69. Litvinko N. M., Kalinichenko E. N., Zhernosek E. V., Kuchuro S. V. *Konjugate of phospholipid with modified nucleoside, pharmaceutical composition and agent that increases resistance to the action of pancreatic phospholipase A_2* . Patent BY № 11905. Publ. date 28.02.2008 (in Russian).

70. Litvinko N. M., Remeeva E. A., Artsemyeva J. N., Zinchenko A. I., Gerlovsky D. O., Birichevskaya L. L., Pavluchenko N. I., Mikhailopulo I. A. The enzymatic synthesis of Phospholipide-Nucleoside conjugates and study of their substrate activity for the digestive phospholipase A_2 . *Journal of Nanotechnology: Nanomedicine & Nanobiotechnology*, 2020, vol. 7, pp. 55–56.

71. Wu Y., Raymond B., Goossens P. L., Njamkepo E., Guiso N., Paya M., Touqui L. Type-IIA secreted phospholipase A_2 is an endogenous antibiotic-like protein of the host. *Biochimie*, 2010, vol. 92, pp. 583–587. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.01>

72. Al-Attar A., Alimova Y., Kirakodu S., Kozal A., Novak M. J., Stromberg A. J., Orraca L., Gonzalez-Martinez J., Martinez M., Ebersole J. L., Gonzalez O. A. Activation of Notch-1 in oral epithelial cells by *P. gingivalis* triggers the expression of the antimicrobial protein PLA₂-IIA. *Mucosal Immunology*, 2018, vol. 11, no. 4, pp. 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0014-7>

73. Jimenez M. A continuous spectrophotometric assay for phospholipase A_2 activity. *Analytical Biochemistry*, 2003, vol. 319, no. 1, pp. 131–137. [https://doi.org/10.1016/s0003-2697\(03\)00331-2](https://doi.org/10.1016/s0003-2697(03)00331-2)

74. Litvinko N. M., Antonchik G. N., Glushakova T. G., Gerlovsky D. O. Features of the protein-protein interaction of cytochrome P450 and PLA₂ of different nature revealed using circular dichroism spectroscopy. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2016, vol. 60, no. 6, pp. 64–71 (in Russian).

75. Litvinko N. M., Skorostetskaya L. A., Gudko T. G., Tsimokhova M. M., Kamyshnikov V. S., Vizhinis E. I., Vorobey V. A. Supramolecular complex of fatty acid with hemoglobin as an indicator of phospholipolysis to identify experimental pancreatitis. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2016, vol. 60, no. 4, pp. 82–88 (in Russian).

76. Litvinko N. M., Skorostetskaya L. A., Kuchuro S. V., Rakhuba G. N. *Method for determining the activity of phospholipase A_2 in blood serum*. Patent BY № 12552. Publ. date 30.06.2009 (in Russian).

77. Litvinko N. M., Skorostetskaya L. A. *Method for diagnosing pancreatitis by A_2 level of serum phospholipase activity*. Patent BY № 13143. Publ. date 30.04.2010 (in Russian).

78. Burlakova E. B. Bioantioxidants. *Russian Journal of General Chemistry*, 2007, vol. 77, no. 11, pp. 1983–1993. <https://doi.org/10.1134/s107036320711028x>

Информация об авторах

Литвинко Наталья Михайловна – д-р хим. наук, доцент, зав. лаб. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Акад. 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 the laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Science of Belarus (5/2, Acad. V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: al_h@mail.ru