

АГЛЯДЫ

УДК 577.152.3

Н. М. ЛИТВИНКО

МЕЖФАЗНЫЙ КАТАЛИЗ ЛИПОЛИТИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ
В БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ:
ОСОБЕННОСТИ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь, e-mail: al_h@mail.ru*

Обзор основных экспериментальных результатов в области изучения межфазного катализа липолитических реакций с участием фосфолипаз A_2 и C разной специфичности в присутствии ряда биологически активных соединений, содержащих в своей структуре фрагменты, которые потенциально могут взаимодействовать с функционально значимыми участками активного центра этих липолитических ферментов. Предложено использование фосфолиполиза в качестве индикатора для определения биобезопасности ксенобиотиков и диагностики острого некротического панкреатита.

Ключевые слова: фосфолипаза A_2 и фосфолипаза C , фосфолиполиз, панкреатит, пестициды, физиологически активные соединения.

N. M. LITVINKO

INTERPHASE CATALYSIS OF LIPOLYTIC REACTIONS IN BIOORGANIC CHEMISTRY:
FEATURES AND PRACTICAL APPLICATION*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus, e-mail: al_h@mail.ru*

The main experimental results on interfacial catalysis of lipolytic reactions involving phospholipases A_2 and C with different specificity in the presence of some biologically active compounds containing fragments that could potentially interact with functionally important sites of the active center of these lipolytic enzymes, have been discussed. It has been suggested to use phospholipolysis as an indicator to determine the biosafety of xenobiotics and diagnostics of acute necrotizing pancreatitis.

Keywords: phospholipase A_2 and phospholipase C , phospholipolysis, pancreatitis, pesticides, physiologically active compounds.

Введение. Основные причины интенсивного изучения липолитических реакций и их катализаторов изложены в фундаментальном труде Брокерхоффа и Дженсена [1]. Интерес к исследованию ферментов липолиза связан с обеспечением ими жизненно важных метаболических процессов – от обновления клеточных мембран в результате пищеварения до апоптоза (клеточной смерти), а также с использованием в синтезе липидов и при их анализе.

Функционирование фосфолиполитических ферментов проявляется в гемолитическом, нейротоксическом и некротическом действиях ядов, а также в патогенезе воспалительных (острый некротический панкреатит, перитонит), инфекционных (газовая гангрена), кардиологических (ишемия миокарда), аллергических, онкологических и других социально опасных болезней [2].

Липолитические природные катализаторы расщепляют с участием воды эфиры высших жирных кислот [1]: липаза (КФ 3.1.1.3), холестерол-эстераза (КФ 3.1.1.13), фосфолипазы A_1 и A_2 (КФ 3.1.1.4), лизофосфолипаза (КФ 3.1.1.5), фосфатидат-фосфогидролаза (КФ 3.1.3.4), фосфолипаза C (КФ 3.1.4.3), сфингомиелиназа (КФ 3.1.4.–), фосфолипаза D (КФ 3.1.4.4), N -ацилсфингозин-ацилгидролаза или церамидаза (КФ 3.1.5.–).

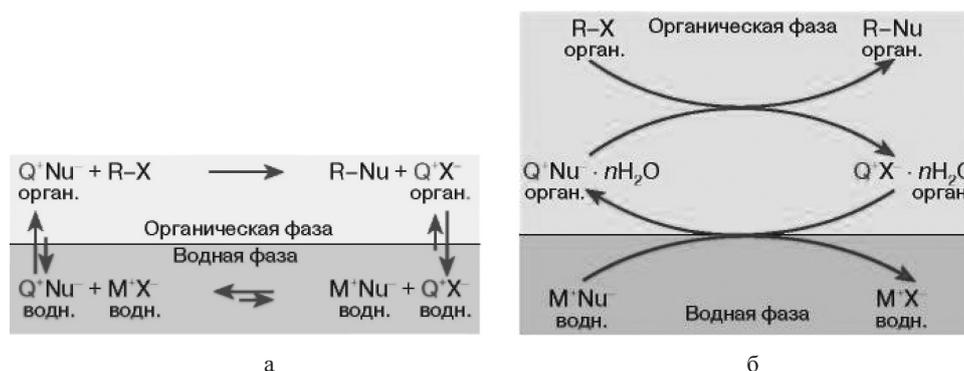


Рис. 1. *а* – каталитический цикл Старкса: катализатор проходит через границу раздела фаз, выполняя челночные рейсы из фазы в фазу [11]; *б* – альтернативная модель: катализатор не выходит из органической фазы; обмен анионов происходит на границе раздела фаз [11]

Спиртовая группа эфиров высших жирных кислот может быть представлена как глицерином (субстрат для липазы) или его фосфопроизводным (субстрат для фосфолипазы A_1 и A_2 , лизофосфолипазы, галактолипазы), так и стеринном (субстрат для холестерол-эстеразы). Такие эфиры относятся к природным или физиологическим субстратам. Вместе с тем большинство липолитических ферментов может катализировать гидролиз также искусственно полученных сложных эфиров жирных кислот.

Все липолитические ферменты, в том числе и фосфолипазы, являются биокатализаторами межфазного катализа, поскольку осуществляют свою функцию на поверхности раздела «липид–вода». Обобщению результатов исследования суперсемейства фосфолипаз в последнее время посвящены многочисленные обзоры, в которых излагаются данные о структурных особенностях, специфике взаимодействия с межфазной поверхностью, их функции и патологических процессах, сопровождаемых повышенным уровнем активности этих ферментов [3–10].

Основная часть. Понятие межфазного катализа хорошо известно из области экспериментальной органической химии [11], с тех пор как сотрудники промышленных лабораторий Ч. Старкс («Continental Oil», США), А. Брэнстрем («AB Hassle», Швеция) и М. Макоша (Варшавский технологический университет) почти одновременно сформулировали основные принципы каталитических процессов, происходящих на границе между органической и водной фазами, и на многочисленных примерах показали их уникальные возможности (рис. 1, *а*, *б*).

В соответствии с моделью Старкса (рис.1, *а*) липофильный катион Q^+ выполняет транспортную функцию по отношению к анионам Nu^- и X^- , обеспечивая челночные рейсы соответствующих ионных пар из фазы в фазу. Согласно другой схеме (рис.1, *б*), липофильный катион Q^+ вообще не покидает органической фазы, обмен же анионов происходит непосредственно на границе поверхности фаз.

Безусловно, механизмы действия катализаторов межфазного переноса и обычных катализаторов органических и биоорганических реакций принципиально различны. В то же время полагают, что усматривается некоторая аналогия в механизмах действия катализаторов межфазного переноса в органической химии и биологических катализаторов – ферментов: и для тех и для других чрезвычайно важно локализовать реагенты в нужной точке пространства с учетом поверхности раздела фаз [11]. Действительно, в этом убеждают модели «прыгающего» и «ползающего» ферментов, предложенные для фосфолипидных катализаторов, осуществляющих катализ на поверхности раздела «липид–вода» (рис. 2) [12]:

Осуществление катализа на поверхности раздела между липидной и водной фазами привело к структурным особенностям липолитических ферментов, отличающим их от других биокатализаторов, функционирующих в растворе.

Например, у фосфолипаз A_2 (Е, рис. 3) в молекуле имеется, наряду с каталитическим центром (КЦ*), специфическое приспособление для «узнавания» организованной поверхности раздела «липид–вода», своеобразной «подшвы» (ЦРП*) для прикрепления к межфазной поверхности (М) [13], а также семь аминокислотных остатков с N-конца для защиты от аутолиполиза (рис. 3).

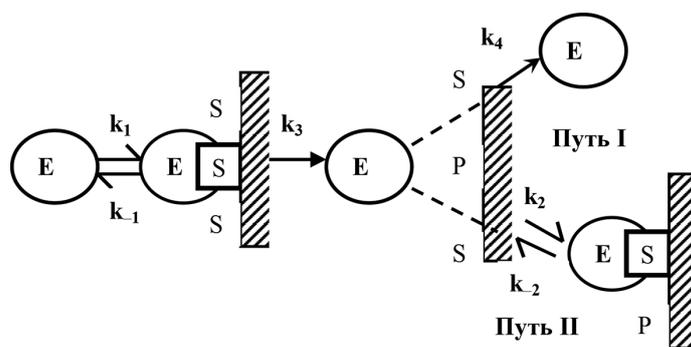


Рис. 2. Модели «прыгающего» и «ползающего» ферментов: I – фермент (E) десорбируется с межфазной поверхности после каждого каталитического акта с образованием продукта (P) и вновь адсорбируется на границе раздела между липидом (S) и водой («прыгающий фермент»); II – фермент (E) находится на межфазной поверхности продолжительный период, осуществляя катализ без выхода в водную фазу («ползающий фермент»)

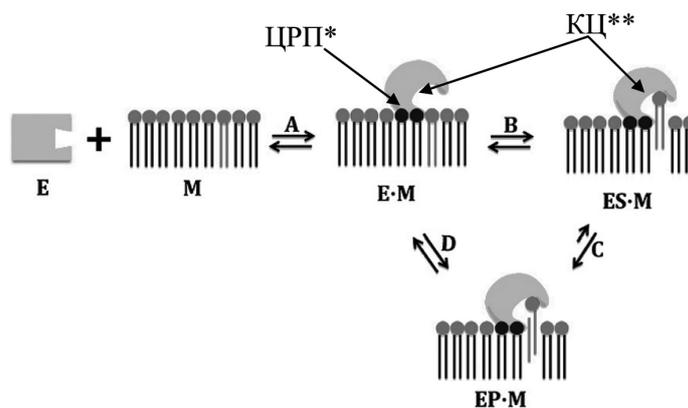


Рис. 3. Схема взаимодействия фосфолипазы A_2 (E) с межфазной поверхностью липидов (S), где ЦРП* – центр распознавания поверхности, КЦ** – каталитический центр, M – межфазная поверхность, P – продукт реакции [13]

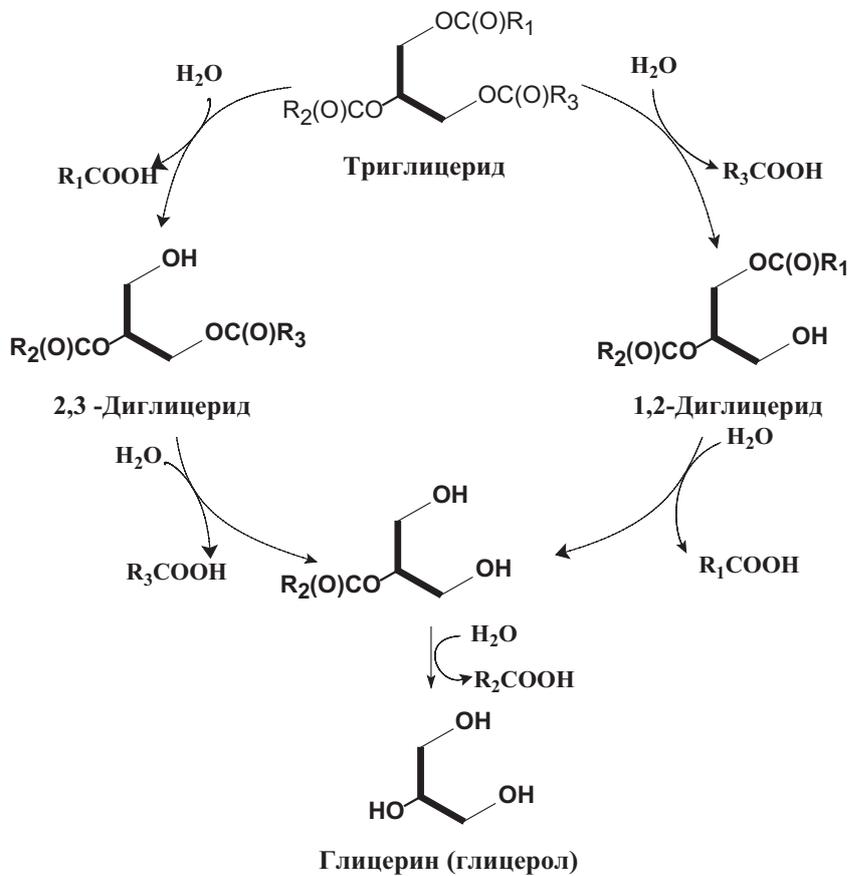
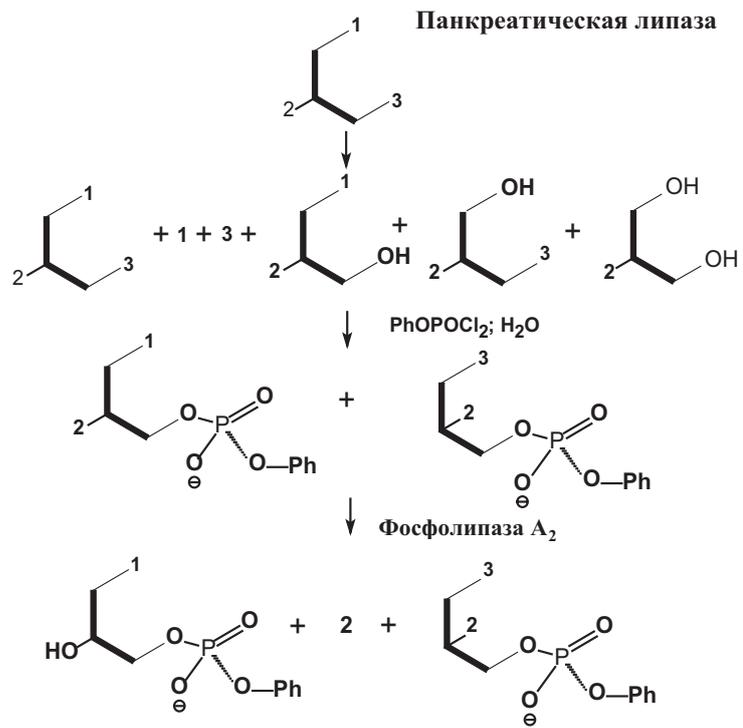
Исследование многими авторами механизма гидролиза фосфолипидов с участием липаз и фосфолипаз [1,13] позволило целенаправленно использовать его в разнообразных превращениях липидов, а также других практических приложениях [2]. Установлено, что применение природных катализаторов фосфолиполиза в синтезе и при анализе липидов вместо обычных катализаторов имеет свои преимущества: снижение энергии активации и наличие у фосфолипаз стерео- и региоспецифичности, а также термостойкости и устойчивости к денатурации.

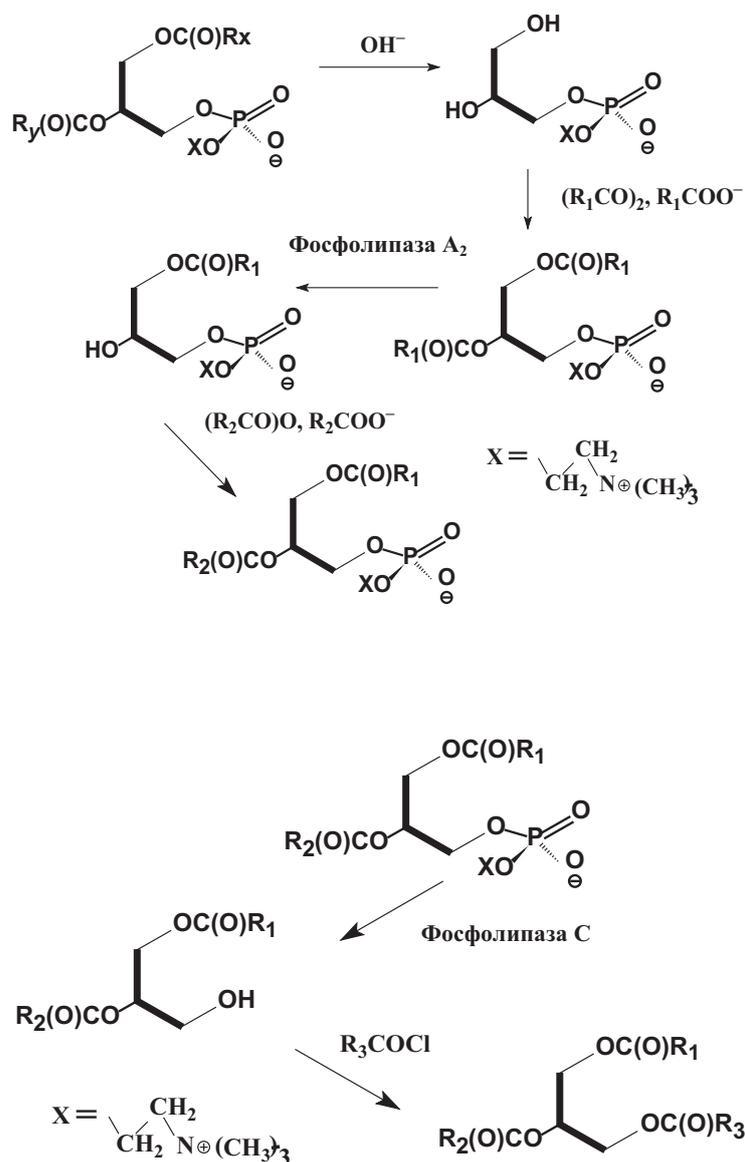
Так, последовательное действие липолитических ферментов разной субстратной специфичности при превращении триглицеридов в лизофосфолипиды дает возможность установить позиционное распределение жирных кислот в липидах [1]. При этом катализ панкреатической липазой реакции элиминации жирных кислот из триглицеридов приводит к смеси 1,2- и 2,3-диглицеридов. Далее смесь обрабатывают фенилдихлорфосфатом, в результате чего образуются *sn*-3- и *sn*-1-фосфоглицериды.

Стереоспецифичная фосфолипаза A_2 гидролизует в этой смеси только *sn*-3-фосфопроизводные с образованием лизофосфолипидов, содержащих жирные кислоты в положении 1. Далее идентифицируют отщепленную жирную кислоту, находившуюся в положении 2. Жирная кислота в положении 3 определяется по разнице состава исходного триглицерида или из *sn*-1-фосфолипида.

Следующая схема показывает последовательность реакций элиминирования жирных кислот при гидролизе триглицеридов под действием панкреатической липазы для получения глицерина.

Суперсемейство фосфолипаз A_2 , которое используется в синтезе липидов для получения фосфоглицеридов со смешанным составом жирных кислот, включает 15 таксономических групп и 5 категорий (секреторные, цитозольные, *Ca*-независимые, ФЛА $_2$ -*RAF*, лизосомальные) [5].



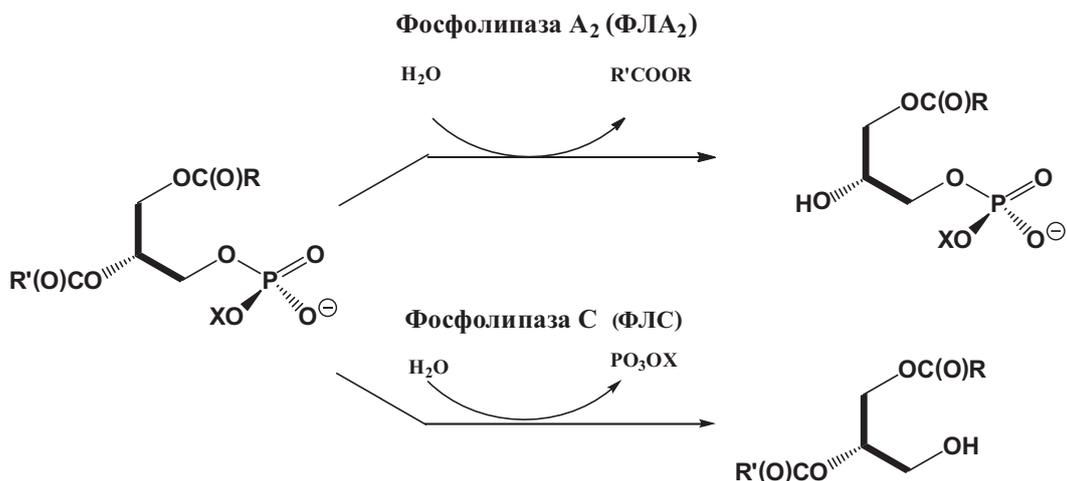


При этом природный фосфатидилхолин (лецитин) после мягкого деацилирования превращается в *sn*-глицерол-3-фосфорилхолин и далее в лецитин, в состав которого входит единственная жирная кислота. Действуя на такой лецитин фосфолипазой A_2 , получают деацилированный в положении 2 продукт, который после ацилирования другой известной жирной кислотой превращается в новый лецитин известного состава.

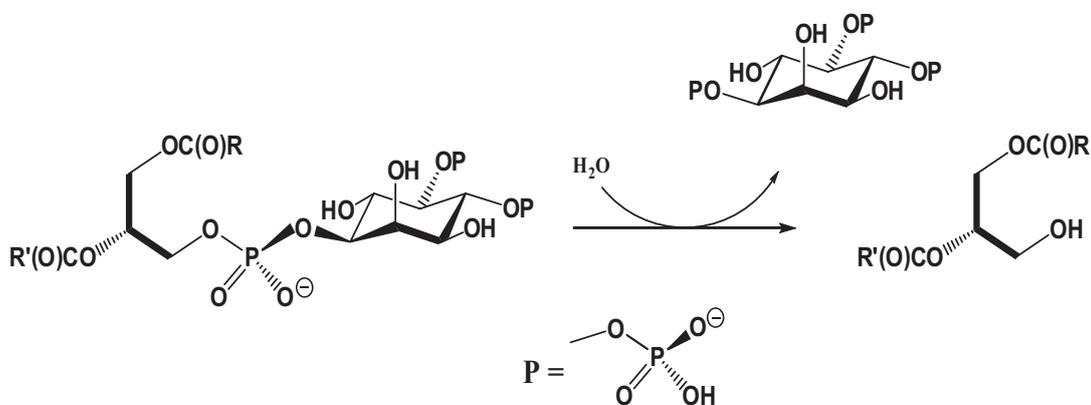
Удаление с помощью фосфолипазы C фосфорилхолиновой группы дает возможность получить диглицерид смешанного кислотного состава, 1,2-диацил-*sn*-глицерин, который ацилируют третьей жирной кислотой. При этом получают триглицерид с определенным стереоспецифическим распределением жирных кислот [1].

С целью разработки практических приложений биоорганических реакций элиминирования жирных кислот, фосфорилированных аминоспиртов и инозита с применением природных катализаторов фосфолипаза нами разработана стратегия исследования межфазного катализа фосфолиполитических реакций на примере фосфолипаз A_2 и C различной специфичности.

Изучены биоорганические реакции гидролиза под действием фосфолипаз A_2 , C и D широкого спектра природных и полусинтетических фосфолипидов различного жирнокислотного состава, в том числе фосфатидил: – холина, – этаноламина, – этанола, – серина, – инозита, – фосфатидилглицерола [12]:



Фосфатидилинозитспецифичная фосфолипаза C (ФИ-ФЛС)



Комплексное исследование продукции высших карбоновых кислот, диглицеридов и органофосфатов в процессе гидролиза фосфолипидов проведено в зависимости от:

1) структуры и свойств катализаторов, включая теоретический анализ первичных структур разных функциональных типов фосфолипаз A₂, топографию их активного центра, изучение иммунохимических свойств поверхности глобулы белка и механизма катализа [12];

2) свойств межфазной поверхности, в том числе заряда (формирование межфазной поверхности отрицательно-, положительно заряженными и нейтральными детергентами или кислыми и цвиттер-ионными липидами) [14, 15], формы ее супрамолекулярной организации (липопротеиновый комплекс, мицеллярная и ламеллярная фазы, природные мембраны) [16, 17]; и структурной упорядоченности фосфолипидов при воздействии внешних (УФ- и радиационное облучение) и внутренних (этанол, лизолипиды, жирные кислоты и их амиды) факторов;

3) ингибирования или активирования фосфолипазы [16].

Результаты исследования межфазного катализа липолитических реакций с использованием фосфолипаз в соответствии с разработанной стратегией привели к важнейшим фундаментальным выводам.

Теоретический анализ первичных структур разных функциональных типов фосфолипаз A₂, в том числе ядов змей, пчелы и поджелудочной железы свиньи в сравнении с протеолитическими ферментами (трипсин, химотрипсин), в каталитическом акте которых принимает участие аминокислотный остаток серина, обнаружил большое сходство в последовательности аминокислот по всей первичной структуре липаз и протеаз, особенно в области активного центра этих ферментов. Это указывало на то, что фосфолипазы по механизму действия относятся к «сериновым катализаторам» и у них общий эволюционный предшественник [12]. Этот вывод получил

подтверждение значительно позже в работах зарубежных авторов по исследованию высокомолекулярных фосфолипаз [13, 18].

Изучение скорости фосфолиполиза в условиях воздействия более 50 соединений, моделирующих в различных сочетаниях фрагменты субстрата, на фосфолипазы A_2 яда кобры, пчелы и поджелудочной железы [19, 20], а также фосфолипазы C микроорганизмов *Clostridium perfringens* и *Bacillus cereus* [21] показало значительное снижение их активности под действием фосфат- и глицеролсодержащих соединений, в том числе в присутствии ряда аминов и их производных, предположительно за счет конкуренции с субстратом за соответствующие центры связывания с ферментом, что убеждает в необходимости для взаимодействия фермента с межфазной поверхностью положительно заряженной «головки» субстрата, т. е. наличие в молекуле фермента ранее не обнаруженного анионного участка (сайта).

Выделение в высокоочищенном состоянии каталитически активного труднорастворимого комплекса цитидинсодержащих нуклеозидов с фосфолипазой A_2 доказывает участие компонентов нуклеиновых кислот в фосфолиполизе [22].

Исследование активности фосфолипаз A_2 разной специфичности по отношению к субстрату, сформированному в мицеллярную и ламеллярную фазы или в виде липопротеинового комплекса и цельных клеточных мембран показывает, что фосфолиполитические ферменты проявляют четко выраженную поверхностную специфичность и первичная регуляция каталитической способности фосфолипаз происходит на надмолекулярном уровне и в большей степени зависит от супрамолекулярной организации межфазной поверхности и ее заряда. Химическая природа субстрата играет второстепенную роль [14, 16, 23, 24].

Изменение специфичности панкреатической ФЛА $_2$ к форме организации межфазной поверхности установлено нами при изменении заряда межфазной поверхности [14, 23, 24] и под действием эффекторов циклогександионового ряда [25–27]. Проведение фосфолиполиза в присутствии некоторых 1,3-циклогександионов, проявляющих пестицидную активность, показывает, что панкреатическая фосфолипаза A_2 не только изменяет свою поверхностную специфичность [28, 29], но и приобретает не свойственную ей в нормальных условиях способность разрушать целостные клеточные мембраны [30].

Впервые обнаружены ингибиторы фосфолиполиза среди 9-*Me*, 10-*Me*, 11-*Me* аналогов простагландинов [31], производных тиотетроновой кислоты [32], производных оксазола, 1,3-циклогександионов [25–29], производных нуклеозидов [33–35], фосфоноглицина [36].

Предложены механизмы воздействия ингибиторов на ФЛА $_2$, в том числе путем изменения ее поверхностной специфичности (схема).



Осуществление выбранной стратегии привело к разработке комплекса оригинальных методов:

- жидкофазной иммобилизации фосфолипазы A_2 на фосфатидилхолине с применением обращенных мицелл для выделения фермента из биологического материала [37];
- разделения и очистки изоферментов фосфолипазы *C Clostridium perfringens* [38];
- получения впервые антител к гидролитическим ферментам [39];
- определения активности фосфолипазы A_2 с использованием ТСХ и концентрационно-зависимого превращения гемоглобина в гемихром под действием жирных кислот [40] и др.

Полученные результаты положены в основу способов предварительного скрининга действия пестицидов и выявления их побочного эффекта на организм человека и животных. Так, нами установлено, что панкреатическая ФЛА₂, которая в организме млекопитающих предназначена для пищеварения, в присутствии пестицидов циклогександионового ряда за счет облегчения взаимодействия с поверхностью раздела «липид–вода» может эффективно атаковать бислой клеточной мембраны, в обычных условиях недоступный для гидролиза ферментом. Обнаружение *in vitro* такого активирующего эффекта пестицида на гидролиз модельной липидной мембраны (липосомы) свыше 20 % по сравнению с контролем предполагает в случае развития такого явления в организме человека возможную опасность развития язв клеточных стенок пищеварительного тракта и может служить тестом на биобезопасность пестицидов [41–44].

Выявление *in vitro* подавления под действием пестицидов гидролиза фосфолипидов в условиях, моделирующих пищеварение, также может стать основой для тестирования их биобезопасности [41–44], так как при реализации в организме человека указывает на возможную недостаточность обеспечения незаменимыми жирными кислотами и, как следствие, простагландинами, лейкотриенами, тромбксанами, что в конечном итоге приводит к соответствующим патологиям, например к бесплодию.

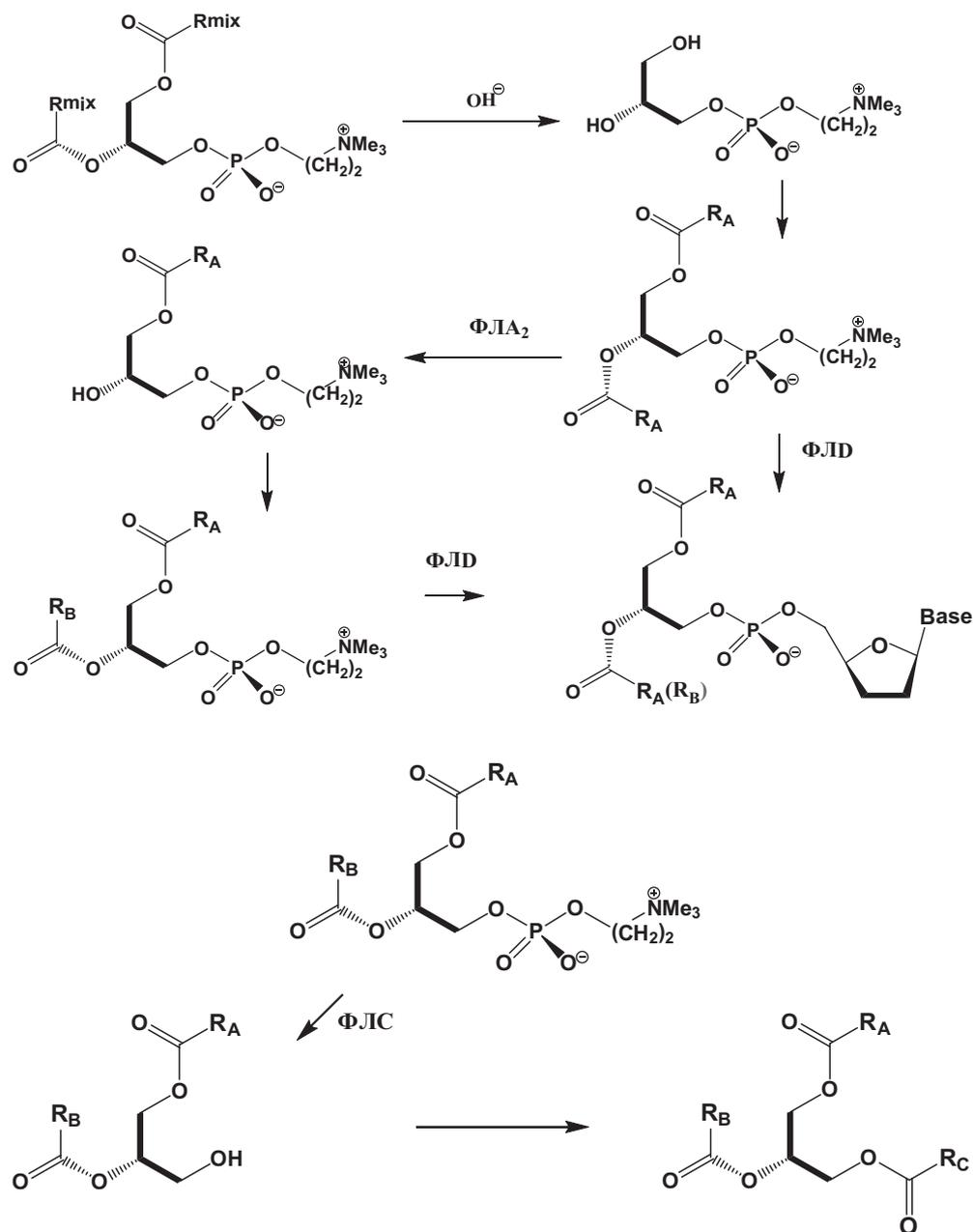
Результаты изучения межфазного катализа фосфолиполиза в присутствии разнообразных химических соединений предполагают применение этой липолитической реакции для скрининга биологического действия широкого круга физиологически активных соединений [45]. При этом ингибирование испытуемым соединением фосфолиполиза с участием ФЛА₂ яда кобры *Naja naja oxiana* будет указывать на его антигемолитическое действие и потенциальную возможность служить противоядием [46, 47]. Аналогичный эффект в случае реакции с участием ФЛА₂ панкреаса будет свидетельствовать о потенциальном антипанкреатитном действии [48].

Так, на основе кинетических зависимостей активности ФЛА₂ в присутствии и в отсутствие рибавирина и его арильных производных обнаружено, что наблюдаемый эффект на протекание липолитической реакции, в том числе через взаимодействие с гидрофобным сайтом ФЛА₂, зависит от структуры и концентрации эффектора, а также от стадии фосфолиполиза в мицеллярной фазе. Установление конкурентного характера ингибирования активности ФЛА₂ под действием кремнийсодержащего производного рибавирина предполагает перспективность этого соединения для дальнейшего изучения в качестве антипанкреатитного средства со смягченным спектром действия.

Рибавирин (1-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) представляет собой аналог пурина, имеющий значительное сходство по структуре с естественным гуанозином, и обладает широким спектром действия в отношении вирусов гепатита С, гриппа, бешенства, ингибирует ряд ферментов, в частности дегидрогеназу аденозинмонофосфата, что приводит к торможению синтеза вирусной РНК и ДНК и гибели перечисленных вирусов.

Синтез и выявление ингибирующего или активирующего действия арильных производных рибавирина на межфазный катализ, осуществляемый ФЛА₂ и проводимый в условиях, моделирующих прохождение пищеварительного тракта, куда выделяется из панкреатической железы ФЛА₂, и на этой основе выяснение роли ароматических заместителей этих эффекторов во взаимодействии с гидрофобным сайтом активного центра фермента, ответственного за прикрепление ФЛА₂ к поверхности раздела «липид–вода», позволяют расшифровать один из механизмов регуляции ее активности и интенсивности фосфолиполиза. Это впоследствии позволит выявить нежелательные побочные действия производных рибавирина и иных действующих веществ нуклеиновой природы, проявляющих противовирусные или противоопухолевые свойства.

Понимание зависимости структура → эффект на примере производных рибавирина обеспечивают в перспективе возможность синтезировать на основе других нуклеозидов более эффективные ингибиторы пищеварительной ФЛА₂, нежелательное увеличение активности которой сопровождается развитием острого некротического панкреатита и других опасных для жизни человека патологий. При этом можно использовать фосфолипазы различной специфичности А₂, С (ФЛС) и D (ФЛД) в качестве эффективных биокатализаторов химических превращений фосфолипидов и нуклеозидов:



В профилактике и лечении болезней человека, как показывает мировая медицинская практика, исключительное значение приобретают методы ранней биохимической диагностики, непосредственно связанные с выявлением повышенного уровня активности ферментов, сопутствующего определенным патологическим процессам, т. е. их специфических маркеров. Таким высокоспецифическим маркером в патофизиологии острого панкреатита признана панкреатическая ФЛА₂. Активность и количество в сыворотке крови разных представителей семейства фосфоли-

паз коррелирует со степенью и других социально опасных заболеваний, таких как ишемический инсульт, ревматоидный артрит, псориаз, лучевая болезнь и др. При такой глубокой вовлеченности ФЛА₂ в сопровождение различных патологий становится понятной острая необходимость в разработке надежных, простых и достоверных способов определения этого жизненно важного фермента.

Химия фосфолипаз – сложившееся направление в липидной энзимологии, интенсивно развиваемое в мировой науке только с 70-х годов прошлого столетия. Они, как показано выше, относятся к особой категории ферментов, поскольку осуществляют межфазный катализ и действуют только на поверхности раздела между водой и нерастворимым липидом (субстратом). Последнее оказывается существенным препятствием в их практическом применении. До разработанной нами уникальной методологии оценки фосфолиполиза с использованием разностной спектрофотометрии при участии метгемоглобина ни в Беларуси, ни в странах ближнего и дальнего зарубежья не были найдены оптимальные пути устранения методических трудностей по определению активности ФЛА₂ в биологических объектах, связанных с формированием удобной формы не растворимого в воде природного субстрата для эффективного проведения ферментативной реакции. Существующие в клиничко-лабораторной практике традиционные методы определения активности ФЛА₂ *in vitro* трудоемки [2], требуют больших затрат субстратов, времени и практически исчерпали свой потенциал.

Такое положение до настоящего времени препятствовало использованию ФЛА₂ для своевременной постановки диагноза указанных заболеваний, расшифровки механизмов патогенеза и оценки прогноза его дальнейшего развития. Поэтому липолитическая реакция с участием панкреатической ФЛА₂ послужила основой разработки в лаборатории прикладной энзимологии Института биоорганической химии НАН Беларуси способа для поиска потенциальных средств антипанкреатитного действия среди физиологически активных соединений, в том числе производных тиотетрановой кислоты и модифицированных нуклеозидами липидов, новизна которых защищена получением ряда патентов Республики Беларусь [46–50]. С целью применения ФЛА₂ в диагностических целях был создан и запатентован уникальный способ ее выделения из поджелудочной железы, основанный на экстракции фермента с помощью субстрата, растворенного в органическом растворителе, в отсутствие кофактора [37]. Разработана технология производства и выпущена совместно с ХОП ИБОХ опытная партия набора реагентов «ФЛА₂–ФОА» для определения в сыворотке крови активности (количества) панкреатической фосфолипазы А₂ [51–56].

Заключение. Современное мировое научное сообщество характеризуется грандиозным научно-техническим прорывом в нано- и биотехнологиях, в котором инженерная энзимология, как новое перспективное направление, играет основополагающую роль. В нем удачно сочетаются последние достижения органической и биоорганической химии, биохимии и молекулярной биологии, энзимологии и химической технологии. Развитие этого направления в перспективе на базе созданного в Институте биоорганической химии «Ведущего научного центра по изучению химических основ жизни» предусматривает выявление структурно-функциональных особенностей биокатализа, изучение ферментов в экстремальных условиях, становление медицинской энзимологии, создание индустриального биокатализа, расширение границ применения ферментов в тонком органическом синтезе, утилизацию промышленных отходов с помощью ферментов, использование ферментов для биоэлектрохимических преобразователей энергии, конструирование биокатализаторов и так далее.

Овладение закономерностями протекания фосфолиполиза вооружает ученых неограниченными возможностями контроля и управления нежелательными побочными эффектами при нарушении нормального протекания этого процесса. Поэтому наши исследования имеют широкую перспективу для развития медицинского раздела инженерной энзимологии – энзимопатологии и энзимодиагностики.

Таким образом, фосфолиполиз, или ферментативная биоорганическая реакция расщепления фосфолипидов, и результаты исследования его фундаментальных аспектов (раскрытие механизмов подавления или усиления активности ФЛА₂ в присутствии указанных эффекторов) подтверждают перспективность их использования в новом практическом приложении – в качестве

индикатора для определения действия ксенобиотиков, в частности обнаружения побочного действия субстанций лекарственных препаратов в условиях, моделирующих прохождение пищеварительного тракта, богатого панкреатической ФЛА₂.

Автор выражает благодарность всем коллегам, участвовавшим в выполнении перечисленных выше исследований.

Список использованной литературы

1. Брокерхофф, Х. Липолитические ферменты /Х. Брокерхофф, Р. Дженсен. – М: Мир,1978. – 278 с.
2. Tappia, P. S. Phospholipases in Health and Disease /P. S. Tappia, N. S. Dhalla. – New York: Springer, 2014. – 410 p.
3. Wei, Xu. Structural Insight into the Activation Mechanism of Human Pancreatic Phospholipase A₂ / Xu Wei, Lina Yi, Yumei Feng, Ling Chen, Jinsong Liu // J. Biol Chem. – 2009. – Vol. 284, № 24. – P. 16659–16666.
4. Murakami, M. Recent progress in phospholipase A₂ research: From cells to animals to humans / M. Murakami, Y. Taketomi; Y. Miki, H. Sato, T. Hirabayashi; K. Yamamoto // Progress in Lipid Research. – 2011. – Vol.50, № 2. – P. 152–192.
5. Cao, J. Using Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry to Define the Specific Interactions of the Phospholipase A₂ Superfamily with Lipid Substrates, Inhibitors, and Membranes /J. Cao, J. E. Burke, E. A. Dennis // Journal of Biological Chemistry. – 2013. – Vol. 288, № 3. – P. 1806–1813.
6. Feng, Y. Two novel approaches targeting cancer cell membrane for tumor therapy / Y. Feng, B. Wang, Y. Cao, R. He // Medical Hypotheses. – 2013. – Vol. 80, № 4. – P. 380–382.
7. Vines, C. M. Phospholipase C / C. M. Vines // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2012. – Vol. 740 (Calcium Signaling). – P. 235–254.
8. Nakamura, Y. Physiological functions of phospholipase Cd1 and phospholipase Cd3 / Y. Nakamura, K. Kanemaru, K. Fukami // Advances in Biological Regulation. – 2013. – Vol. 53, № 3. – P. 356–362.
9. Lipases and Phospholipases /A. Aloulou [at al.] // Methods in Molecular Biology. – New York: NY, United States. – 2012. – Vol. 861. – P. 63–85.
10. Peng, X. Mammalian phospholipase D physiological and pathological roles /X. Peng; Frohman M. A. // Acta Physiologica. – 2012. – Vol. 204, № 2. – P. 219–226.
11. Островский, В. А. Межфазный катализ органических реакций / В. А. Островский // Соросов. образоват. журн. – 2000. – Т. 6, № 11. – С. 30–34.
12. Литвинко, Н. М. Эндогенные фосфолипазы A₂ / Н. М. Литвинко, М. А. Кисель. – Минск: Наука и техника, 1991. – 270 с.
13. Mouchlis V. D. Membranes serve as allosteric activators of phospholipase A₂, enabling it to extract, bind, and hydrolyze phospholipid substrates / V. D. Mouchlis, D. Bucher, J. A. McCammon, E. A. Dennis // Proc Natl Acad Sci USA. – 2015. – Vol. 112, № 6. – P. 1–10.
14. 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.
15. 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, №9. – P. 1027–1031.
16. Литвинко, Н. М. Активность фосфолипаз A₂ и C при биохимическом моделировании /Н. М. Литвинко. – Изд. 2-е. – Минск: Технопринт, 2003. – 350 с.
17. The comparative study of the phospholipase A₂ -catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol in the presence of cytochrome P-450 / N. M. Litvinko [at al.] // Synthesis of Natural Products Biotechnology. – Sophia, 1985. – P. 158–162.
18. Six, D. A. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization /D. A. Six, E. A. Dennis, // Biochim. Biophys. Acta. – 2000. – Vol. 1488, № 1–2. – P. 1–19.
19. 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, № 7. – P. 1586.
20. 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, № 1(I). – P. 68–75.
21. 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, № 6 (II). – P. 838–842.
22. 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, № 6. – P. 585–589.
23. The influence of protein-lipid electrostatic interaction on the enzymatic hydrolysis of phospholipids // Bioorganic Chemistry: Enzymes, Peptides, Hormone Receptors, Biogenesis and Biosynthesis, Antibiotics / N. M. Litvinko [at al.]. – Varna: Bulgaria, 1989. – P. 129–133.
24. Study of lipolysis in model membranes in the presence of positively charged soluble proteins /N. M. Litvinko, M. K. Naubatova, M. A. Kisel, A. A. Akhrem // Biochemistry (Moscow). – 1992. – Vol. 57, № 4. – P. 411–416.
25. Влияние грамицидов на активность панкреатической фосфолипазы A₂ /Н. М. Литвинко [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук. – 2007. – № 3. – С. 82–87.

26. Фосфолипидные реакции как модель для определения безопасности пестицидов / Ф. А. Лахвич [и др.] // Докл. НАН Беларуси. – 2008. – Т. 52, № 1. – С. 70–74.
27. Действие серосодержащих гетероциклических β -ди- и β -трикарбонильных производных на активность секреторных и внутриклеточных фосфолипаз A_2 / Н. М. Литвинко [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук. – 2008. – № 1. – С. 86–93.
28. Активность секреторной фосфолипазы A_2 в условиях образования мезомерных форм ряда производных циклогексан-1,3-диононов / Ф. А. Лахвич [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук. – 2009. – № 2. – С. 77–81.
29. Антikonкурентное ингибирование активности панкреатической фосфолипазы A_2 под действием 2-пропаноил-5-(2,4,6-триметилфенил)-циклогексан-1,3-дионона / Д. О. Герловский, Н. М. Литвинко, С. В. Кучуро, Н. М. Грось // Докл. НАН Беларуси. – 2009. – Т. 53, № 4. – С. 73–76.
30. Литвинко, Н. М. Особенности фосфолиполиза под действием производных 1,3-циклогександиона / Н. М. Литвинко, Д. О. Герловский // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук. – 2012. – № 2. – С. 77–81.
31. Synthesis and antiphospholipase activity of 3,5-disubstituted thiotetronic acid derivatives / D. B. Rubinov [et al.] // Russian Journal of Organic Chemistry. – 2006. – Vol. 42, № 3. – P. 423–429.
32. 3,5-Дизамещенные производные тиотетроновой кислоты – новые ингибиторы секреторных фосфолипаз A_2 / С. В. Кучуро [и др.] // Докл. НАН Беларуси. – 2004. – Т. 48, № 1. – С. 65–68.
33. Действие фосфолипаз на химерные субстраты, созданные на основе фосфолипидов и компонентов нуклеиновых кислот / Н. М. Литвинко [и др.] // Докл. НАН Беларуси. – 2005. – Т. 49, № 4. – С. 70–73.
34. Влияние модификации этаноламинового фрагмента субстрата на активность панкреатической фосфолипазы A_2 / С. В. Кучуро [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук. – 2006. – № 3. – С. 79–82.
35. Фосфодизфирные производные ацикловира – новые ингибиторы панкреатической фосфолипазы A_2 / Д. О. Герловский [и др.] // Докл. НАН Беларуси. – 2010. – Т. 54, № 1. – С. 75–82.
36. Литвинко, Н. М. Влияние *N*(фосфонометил)-глицина на фосфолипидную реакцию с участием фосфолипазы A_2 / Н. М. Литвинко, Л. А. Скоростецкая, Д. О. Герловский // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук. – 2015. – № 3. – С. 91–100.
37. Способ выделения фосфолипазы A_2 : пат. 8416 Респ. Беларусь: МПК⁷ C12N 9/16 (2006)/Н. М. Литвинко; дата публ.: 30.08.2006.
38. Separation and purification of isoenzymes of phospholipase C of *Clostridium perfringens* / G. F. Shemanova [et al.] // Applied Biochemistry and Microbiology. – 1978. – Vol. 14, № 3. – P. 314–318.
39. Получение антител к гидролитическим ферментам и выявление их в реакции пассивной гемагглютинации / Шеманова Г. Ф [и др.] // Иммунология. – 1981. – № 1. – С. 43–46.
40. Litvinko, N. M. Study of phospholipase A_2 hydrolysis using conversion of methemoglobin to hemichrome / N. M. Litvinko, G. M. Andreyuk, M. A. Kisel // FASEB Journal. – 1997. – Vol. 11, № 9 (C. A.1306). – P. 2623.
41. Способ предварительной оценки безопасности пестицида или его метаболита для животных и человека: пат. 14325 Респ. Беларусь: МПК (2009) C 12Q 1/25 / Н. М. Литвинко, Ф. А. Лахвич, С. В. Кучуро, Д. О. Герловский; дата публ.: 30.04.2011.
42. Способ предварительной оценки безопасности гербицида для животных и человека: пат. 14326 Респ. Беларусь: МПК (2009) C 12Q 1/25 / Н. М. Литвинко, Ф. А. Лахвич, Л. А. Скоростецкая, Д. О. Герловский; дата публ.: 30.04.2011.
43. Способ выявления допустимых для человека и животных доз тралкоксидима и его производных: пат. 017271 Евразийской патентной организации: МПК C12Q 1/44 (2006.01), G01N 33/52 (2006.01) / Н. М. Литвинко, Л. А. Скоростецкая, Д. О. Герловский; дата публ.: 30.11.2012.
44. Способ установления безопасной для человека и животных дозы химических средств защиты растений: пат. 017381 Евразийской патентной организации: МПК C12Q 1/44 (2006.01), G01N 30/90 (2006.01) / Н. М. Литвинко, С. В. Кучуро, Д. О. Герловский; дата публ.: 28.12.2012.
45. Способ определения эффекторных свойств физиологически активных соединений : пат. 5752 Респ. Беларусь: МПК⁷ G 01N 33/15, C 12Q 1/34 / Н. М. Литвинко, С. В. Кучуро, Т. А. Желдакова, Е. Р. Филич; дата публ.: 30.12.2003.
46. Производные β -трикетонов тиофенового ряда, проявляющие антифосфолипазную активность антигемолитического профиля действия: пат. 10192 Респ. Беларусь: МПК (2006) C 07 D 333/00; A 61P 43/00 / Д. Б. Рубинов, Т. А. Желдакова, Н. М. Литвинко, С. В. Кучуро, Г. Н. Рахуба; дата публ.: 28.02.2008.
47. Способ определения антигемолитической активности химических соединений: пат. 10604 Респ. Беларусь: МПК (2006) G 01 N 33/00 / Н. М. Литвинко, С. В. Кучуро, Г. Н. Рахуба, Д. Б. Рубинов, Т. А. Желдакова; дата публ.: 30.06.2008.
48. 3,5-Дизамещенные производные тиотетроновой кислоты, проявляющие антифосфолипазную активность антипанкреатического профиля действия и способ их получения: пат. 10191 Респ. Беларусь: МПК (2006) C 07D 333/00; A 61P 1/00 / Д. Б. Рубинов, Т. А. Желдакова, Н. М. Литвинко, С. В. Кучуро, Г. Н. Рахуба; дата публ.: 28.02.2008.
49. Конъюгат фосфолипида с модифицированным нуклеозидом, фармацевтическая композиция и средство, повышающее устойчивость к действию панкреатической фосфолипазы A_2 : пат. 11905 Респ. Беларусь: МПК (2006) C 07N 19/00, A 61K 31/7042, A 61K 31/66 / Н. М. Литвинко, Е. Н. Калиниченко, Е. В. Жерносек, С. В. Кучуро; дата публ.: 30.06.2009.
50. Модифицированный 2',3'-дидезоксиуридином фосфолипид, фармацевтическая композиция и противоядие к действию яда кобры: пат. 11904 Республики Беларусь: МПК (2006) C 07N 19/00, A 61K 31/7042, A 61K 31/66, A 61P 39/00 / Н. М. Литвинко, Е. Н. Калиниченко, Е. В. Жерносек, С. В. Кучуро; дата публ.: 24.02.2009.

51. *Литвинко Н. М.* Фосфолиполитические ферменты: инновационные подходы к использованию в биотехнологии и медицине/ Н. М. Литвинко // Наука – инновационному развитию общества/ Нац. акад. наук Беларуси; редкол.: М. В. Мясникович [и др.]. – Минск: Беларус. навука. – 2009. – С. 279–284.
52. Способ определения активности фосфолипазы A_2 в сыворотке крови: пат. 12552 Респ. Беларусь: МПК (2006) С 12Q 1/34 / Н. М. Литвинко, Л. А. Скоростецкая, С. В. Кучуро, Г. Н. Рахуба; дата публ.: 30.10.2009.
53. Способ диагностики панкреатита по уровню A_2 фосфолипазной активности сыворотки крови: пат.13143 Респ. Беларусь: МПК (2009), А 61В 5/145, С 12Q 1/34 / Н. М. Литвинко, Л. А. Скоростецкая; дата публ.: 30.04.2010
54. Разработка отечественных тест-систем нового поколения для фотометрического определения активности панкреатической фосфолипазы A_2 в крови / Н. М. Литвинко, В. С. Камышников, Л. А. Скоростецкая, Д. О. Герловский // *ARS medica*. – 2011. – № 13(49). – С. 66–75.
55. Апробация новой тест-системы в модельных экспериментах на клиническом материале / Н. М. Литвинко [и др.] // *Лабораторная диагностика. Восточная Европа*. – 2014. – № 4. – С. 49–57.
56. *Литвинко Н. М.* Разработка и освоение новой биохимической тест-системы для выявления воспалительных процессов желудочно-кишечного тракта с использованием ключевых ферментов-маркеров / Литвинко Н. М. [и др.] // Наука – инновационному развитию общества/ Нац. акад. наук Беларуси; редкол.: В. Г. Гусаков [и др.]. – Минск: Беларус. навука, 2014. С. 218–228.

Поступила в редакцию 15.09.2015