

ISSN 1561-8323 (Print)  
ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 577.152.3: 547.92  
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-3-309-319>

Поступило в редакцию 14.05.2021  
Received 14.05.2021

**Н. М. Литвинко**

*Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

## ИНГИБИРОВАНИЕ ФОСФОЛИПАЗЫ $A_2$ ПРОИЗВОДНЫМИ ВИРАЗОЛА

*(Представлено членом-корреспондентом И. А. Михайлопуло)*

**Аннотация.** Изучена кинетика гидролиза фосфатидилхолина (ФХ) под действием панкреатической фосфолипазы  $A_2$  IB (КФ 3.1.1.4, ФЛА $_2$ ) в присутствии липофильного производного виразола – 1-(3-(*tert*-бутилдиметилсилилокси)-4-гидрокси-5-(((4-метоксифенил)дифенилметокси)метил)тетрагидрофуран-2-ил)-1H-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (Виразол<sup>23Г</sup>), обладающего противовирусным действием. Количественно охарактеризованы обе стадии фосфолиполиза: связывания фермента ( $K_s$ ) с поверхностью раздела фаз «липид–вода» и непосредственно каталитический акт ( $K_m$ ) с определением максимальной скорости реакции ( $V_{max}$ ). Обнаружено, что Виразол<sup>23Г</sup> в концентрации 0,5 мкмоль/мл не влияет на величину  $K_s$ ; напротив, константа Михаэлиса,  $K_m$ , возрастает в 1,8 раза наряду с постоянством параметра  $V_{max}$ . На основании постоянства величин  $K_s$  можно предполагать отсутствие в условиях данного эксперимента торможения распада комплекса фермент–мицелла в присутствии эффектора. Кинетические параметры реакции (увеличение величины  $K_m$  и неизменность  $V_{max}$  в присутствии Виразол<sup>23Г</sup>) свидетельствуют в пользу умеренного конкурентного ингибирования панкреатической ФЛА $_2$ ,  $K_i = 65$  мМ, что указывает на возможность поиска биологической активности антипанкреатитного действия в ряду про-лекарств (pro-drugs) нуклеозидной природы.

**Ключевые слова:** ингибиторы панкреатической фосфолипазы  $A_2$ , производные и аналоги гуанозина, виразол, гидролиз фосфолипидов

**Для цитирования.** Литвинко, Н. М. Ингибирование фосфолипазы  $A_2$  производными виразола / Н. М. Литвинко // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2021. – Т. 65, № 3. – С. 309–319. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-3-309-319>

**Nataliya M. Litvinko**

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

## INHIBITION OF PHOSPHOLIPASE $A_2$ BY VIRAZOLE DERIVATIVES

*(Communicated by Corresponding Member Igor A. Mikhaylopulo)*

**Abstract.** Kinetics of phosphatidylcholine (PC) hydrolysis under the action of pancreatic phospholipase  $A_2$  IB, (EC 3.1.1.4, PLA $_2$ ) in the presence of a lipophilic derivative of the antiviral drug Virazole 1-(3-((*tert*-butyldimethylsilyloxy)-4-hydroxy-5-(((4-methoxyphenyl)diphenylmethoxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-1H-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Virazole<sup>23Г</sup>) was studied. The both steps of phospholipolysis were quantitatively characterized: the binding of the enzyme to the lipid-water interface ( $K_s$ ) and directly the catalytic act ( $K_m$ ) with the determination of the maximum reaction rate ( $V_{max}$ ). It was found that Virazole<sup>23Г</sup> at a concentration of 0.5  $\mu$ mol/ml does not affect the  $K_s$  value; on the contrary, the Michaelis constant,  $K_m$ , increases by a factor of 1.8 along with the constancy of the parameter  $V_{max}$ . Based on the constancy of the  $K_s$  values, it seems to be assumed that there is no inhibition of the disintegration of the enzyme-micelle complex in the presence of the effector under the studied reaction conditions. The kinetic parameters of the reaction (the increase in  $K_m$  and the constancy of  $V_{max}$  in the presence of Virazole<sup>23Г</sup>) testify in favor of a moderate competitive inhibition of pancreatic PLA $_2$ ,  $K_i = 65$  mM, which indicates the possibility of searching for the biological activity of the anti-pancreatitis action in the series of pro-drugs of nucleoside nature.

**Keywords:** inhibitors of pancreatic phospholipase  $A_2$ , guanosine derivatives and analogues, virazole, phospholipid hydrolysis

**For citation.** Litvinko N. M. Inhibition of phospholipase  $A_2$  by Virazole derivation. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2021, vol. 65, no. 3, pp. 309–319 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-3-309-319>

**Введение.** Поиск и изучение ингибиторов панкреатической фосфолипазы  $A_2$  IB (КФ 3.1.1.4, ФЛА $_2$ ) обусловлен особой биологической ролью этого фермента [1]. С изменением количества панкреатической ФЛА $_2$  и ее каталитической активности связан ряд патологических состояний

организма: острый некротический панкреатит, псориаз, ишемический инсульт, ревматоидный артрит, онкологические и воспалительные заболевания ряда жизненно важных органов [2].

Среди гетероциклических соединений, в том числе арил(гетерил)содержащих, выявлен ряд специфических высокоэффективных ингибиторов ФЛА<sub>2</sub>, например, на основе индола [3], конъюгированных индолов и изоксазолов [4], производных бифенила [5], 2-оксоамида [6] и др. [7].

Известно, что АТФ и другие нуклеозидтрифосфаты, имеющие гетероциклический фрагмент в своей структуре, являются эффекторами высокомолекулярных внутриклеточных ФЛА<sub>2</sub> [8; 9]. Сведения относительно влияния различных компонентов нуклеиновых кислот на активность низкомолекулярной пищеварительной ФЛА<sub>2</sub> практически отсутствуют, механизм их возможного действия не изучался. Ранее нами впервые было установлено, что панкреатическая ФЛА<sub>2</sub> образует трудно разделяемый комплекс с некоторыми компонентами нуклеиновых кислот, который был выделен в гомогенном состоянии и обладал повышенной каталитической активностью фермента [10]. Позднее нами было обнаружено, что субстратные свойства конъюгатов фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина с рядом модифицированных нуклеозидов по отношению к ФЛА<sub>2</sub> зависят от нуклеозидной составляющей [11]. Кроме того, фосфодиэфирные производные ацикловира, широко известного противовирусного препарата, являются эффективными конкурентными ингибиторами ФЛА<sub>2</sub> [12]. Результаты этих исследований свидетельствуют в пользу расширенного поиска новых биологически важных производных компонентов нуклеиновых кислот и изучения механизма их действия, в том числе активности в отношении ФЛА<sub>2</sub>.

В связывание ФЛА<sub>2</sub> с фосфолипидными мембранами вовлечены как электростатические, так и гидрофобные взаимодействия. Способность проявлять ферментативную активность на границе двух фаз – отличительная особенность фосфолипаз как ферментов, которые кроме традиционного каталитического центра, где происходит превращение субстрата в продукты, имеют специфический участок в глобуле (сайт распознавания поверхности), ответственный за прикрепление к поверхности раздела «фосфолипид–вода». Поэтому активность ФЛА<sub>2</sub> может регулироваться по двум механизмам, а именно: за счет прямого (рис. 1, 1) связывания с каталитически значимыми аминокислотными остатками в активном (эстеразном) центре, опосредованно (рис. 1, 2) при действии на сайт распознавания поверхности различных эффекторов, в структуру которых входят фрагменты субстрата [13].

Целью данного исследования является установление механизма действия на активность панкреатической ФЛА<sub>2</sub> производного противовирусного препарата вирозола – 1-(3-(трет-бутилдиметилсиланилокси)-4-гидрокси-5-(((4-метоксифенил)дифенилметокси) метил)тетрагидрофуран-2-ил)-

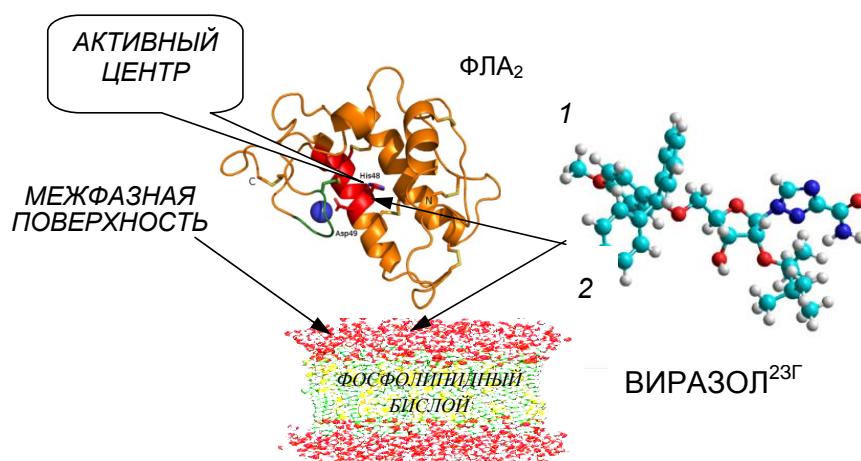


Рис. 1. Гипотетическая схема взаимодействия ФЛА<sub>2</sub> с субстратом в реакции фосфолиполиза в присутствии соединения Виразол<sup>23Г</sup>: трехмерная структура свиной панкреатической секреторной фосфолипазы А<sub>2</sub> группы IB по данным ЯМР (PDB ID [1PIR](#))

Fig. 1. Hypothetic interaction scheme of PLA<sub>2</sub> and the substrate in the phospholipolysis reaction in the presence of Virazole<sup>23G</sup>: three-dimensional structure of the porcine pancreatic secretor phospholipase A<sub>2</sub> of the group IB according to the NMR data (PDB ID [1PIR](#))

1Н-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (производное виразола с двумя защитными группами, сокращенно Виразол<sup>23Г</sup>) путем выявления типа ингибирования на основе изучения кинетики фосфолиполиза.

В настоящей работе мы исходим из того, что изучение типа ингибирования гидролиза фосфатидилхолина (ФХ) с участием ФЛА<sub>2</sub> (конкурентный, неконкурентный, смешанный) в присутствии Виразол<sup>23Г</sup>, с помощью кинетического метода Э. Денниса и соавт. [14] позволит прояснить механизм взаимодействия Виразол<sup>23Г</sup> с ФЛА<sub>2</sub>. Мы полагаем, что кинетические параметры такого взаимодействия позволят обосновать новые подходы к направленному влиянию на активность секреторных фосфолиполитических ферментов. Например, для нормализации повышенной активности ФЛА<sub>2</sub> в случае острого некротического панкреатита, ферментом-маркером которого является этот биокатализатор.

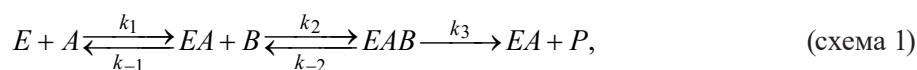
Выбор Виразол<sup>23Г</sup> в качестве объекта исследования основан на результатах скрининга ряда производных нуклеозидов по их влиянию на фосфолиполилиз в условиях геля-диффузии, при этом Виразол<sup>23Г</sup> наиболее эффективно (до 68 %) ингибировал ФЛА<sub>2</sub> [15].

**Материалы и методы исследования.** В работе использовали коммерческий препарат ФЛА<sub>2</sub> поджелудочной железы свиньи (Sigma, P6534), Trizma<sup>TM</sup>, Tris (2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол) и ЭДТА (Serva, Германия), остальные реактивы были производства фирмы Реахим (Россия). Все органические растворители перед использованием очищались перегонкой. Виразол<sup>23Г</sup>, индивидуальность и структура которого подтверждена ВЭЖХ (хроматограф Waters, США), УФ- (Specord M-400 (Карл Цейс, Германия) и <sup>1</sup>Н ЯМР-спектроскопией, синтезирован в рамках совместных исследований, поддержанных Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (грант № X10-096), сотрудниками лаборатории нуклеотидов и полинуклеотидов Института биоорганической химии НАН Беларуси [15]. Фосфатидилхолин выделен из куриного яйца по модифицированной методике [16].

*Исследование фосфолиполиза в присутствии эффектора.* Для установления характера действия (ингибиторное, активирующее, нейтральное) Виразол<sup>23Г</sup> на ФЛА<sub>2</sub> фермент преинкубировали с эффектором в течение 60 мин. Концентрация эффектора составляла 0,5 мкмоль/мл. Смешанные мицеллы готовили включением ФХ в фазу поверхностно-активного вещества – дезоксихолата натрия (ДОХ, анионный детергент, при оптимальном соотношении 1 : 2) после удаления растворителя из раствора ФХ в хлороформе. Диметилсульфоксид (ДМСО) добавляли к 0,05 М Tris-HCl, pH 8,0 – 1 : 10 соответственно.

Реакционная смесь содержала ФХ (0,5 мкмоль), 2 мМ CaCl<sub>2</sub> и 0,05 М Tris-HCl, 8,0. Реакцию гидролиза смешанных мицелл ФХ с ДОХ начинали добавлением в среду при 40 °С раствора ФЛА<sub>2</sub> поджелудочной железы (5 мкг/мл) и останавливали ЭДТА до конечной концентрации 15 мМ, упаривали пробу при 40 °С. Продукты ферментативной реакции анализировали с помощью тонкослойной хроматографии на силикагеле в системе растворителей хлороформ/метанол/вода 10 : 6 : 1. Пластины проявляли реагентом Васьяковского на фосфолипиды [17], пятна фосфолипида и его лизопроизводного высекрбали, в них определяли содержание фосфора по методу, описанному в [17].

*Исследование кинетики ингибирования реакции фосфолиполиза.* Определение кинетических параметров реакции в присутствии эффектора и без него ( $V$ ,  $V_i$ ,  $K_s$ ,  $K_{st}$ ,  $K_m$ ,  $K_{mi}$ ,  $K_i$ ) проводили на основе построения графиков Лайнуивера–Берка в двойных обратных координатах, позволяющих определить тип и механизм ингибирования, а также обосновать возможный путь регуляции ферментативного гидролиза фосфолипидов [18]. Для этого использовали смешанные мицеллы ФХ с ДОХ в условиях двухкомпонентной модели Денниса, предложенной для гидролиза ФЛА<sub>2</sub> смешанных мицелл растворимых короткоцепочечных фосфолипидов с детергентами, когда субстрат на межфазной мицеллярной поверхности полностью доступен для фермента [14] в соответствии со следующей схемой:



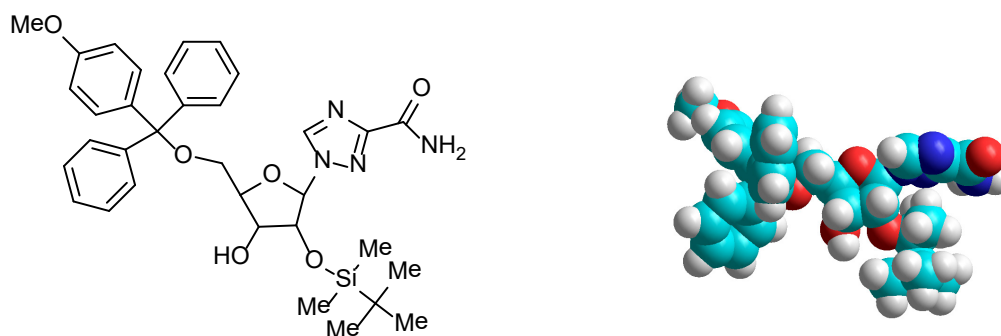
на которой отражено связывание растворимого в воде фермента ( $E$ ) с межфазной мицеллярной поверхностью  $A$  (смешанная мицелла) – общая концентрация фосфолипида и детергента

в объеме (мМ)), затем следует взаимодействие с фосфолипидами ( $B$  – концентрация фосфолипида на поверхности раздела фаз, выраженная как его мольная доля ( $B = Pl / (Pl + D)$ , где  $Pl$  – концентрация фосфолипида,  $D$  – концентрация детергента)), входящими в состав мицелл, и каталитический гидролиз ( $P$  – продукты).

Для проведения кинетического анализа готовили смесь ФХ с ДОХ, отвечающую определенной мольной доле ФХ ( $B$ ) в смешанной мицелле. В первой серии мицелл мольная доля субстрата, составляла 0,333, т. е. соотношение субстрат/детергент 1 : 2, во второй серии  $B = 0,166$  (соотношение субстрат/детергент – 1 : 5), в третьей серии  $B = 0,125$  (соотношение субстрат/детергент – 1 : 7), в четвертой серии  $B = 0,083$  (соотношение субстрат/детергент – 1 : 11). Далее для каждой серии мицелл производили несколько разведений, соответствующих следующей сумме концентраций фосфолипида с ДОХ:  $[A] = 3,0, 6,0, 9,0$  и  $12,0$  мМ. Это обеспечивает изменение концентрации ФХ в пределах межфазной поверхности. Такой подход позволяет создать условия для применения графического метода Лайнуивера–Берка [18] и определения кинетических параметров липолитической реакции при использовании нерастворимого в воде природного субстрата [19]. Затем для каждого разведения в отдельности добавляли кофактор – раствор хлористого кальция (2 мМ), устанавливали необходимое рН (8,0) и вносили раствор фермента (5 мкг/мл).

*Определение активности ФЛА<sub>2</sub>.* В отличие от оригинальной методики [18], предусматривающей определение продукта реакции – жирной кислоты – по увеличению концентрации ионов водорода с помощью рН-стата, в нашей модификации, целенаправленно разработанной для использования нерастворимых нативных субстратов, содержащих длинноцепочечные жирные кислоты [19], активность фермента измерялась более точно по концентрации другого продукта – лизофосфолипида, отделяемого от исходного субстрата с помощью ТСХ и определяемого количественно с использованием реактива Васьяковского и колориметрии [17].

**Результаты и их обсуждение.** Первичный скрининг действия ряда гуанозинсодержащих производных на фосфолипозис липопротеинового комплекса яичного желтка показал, что гуанозин и 2-дезоксигуанозин снижали активность ФЛА<sub>2</sub> на 11 и 21 % соответственно. Однако 6-тио-2'-дезоксигуанозин ингибировал активность данного фермента на 44 % [20]. В условиях диффузии фермента в субстрат-содержащий гель наибольший ингибирующий эффект (до 68 % от контроля) проявил Виразол<sup>23Г</sup>, производное виразола – одного из широко известных противовирусных нуклеозидных препаратов, содержащего две защитные липофильные группы [15], структурные формулы которого представлены ниже:



Известно, что активность ФЛА<sub>2</sub> зависит от заряда и надмолекулярной организации субстрата. В частности, панкреатическая ФЛА<sub>2</sub> специфична к отрицательному заряду межфазной поверхности, поскольку для осуществления пищеварения, в процессе которого гидролизуются фосфолипиды, происходит эмульгирование пищи желчными кислотами.

Изучение влияния Виразол<sup>23Г</sup> на панкреатическую ФЛА<sub>2</sub>, в отличие от наших предыдущих исследований [19], проводили в модельных условиях, оптимальных для фермента (рН, температура) и максимально приближенных к физико-химическому состоянию субстрата в среде пищеварения, поэтому использовали субстрат в мицеллярной фазе, сформированной детергентом с отрицательным зарядом (дезоксихолатом натрия).

В условиях использования субстрата ФЛА<sub>2</sub> в мицеллярной фазе обнаружен выраженный ингибирующий эффект Виразол<sup>23Г</sup>. Данное соединение в концентрации 0,5 мкмоль/мл снижает в 1,4 раза скорость гидролиза ФХ в мицеллярной фазе с 14,6 до 10,2 мкмоль · мин<sup>-1</sup> · мг<sup>-1</sup> (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Кинетика гидролиза ФХ в составе мицеллярной фазы под действием ФЛА<sub>2</sub> в отсутствие (контроль) и присутствии Виразол<sup>23Г</sup>

Table 1. Hydrolysis kinetics of phosphatidylcholine as part of the micellar phase under the action of PLA<sub>2</sub> in the absence (control) and in the presence of Virazole<sup>23Г</sup>

Время, мин Time, min	Скорость реакции, мкмоль · мин <sup>-1</sup> · мг <sup>-1</sup> Reaction rate, μmol · min <sup>-1</sup> · mg <sup>-1</sup>		Относительная скорость реакции, $V_{опыта}/V_{контроля}$ Relative reaction speed $V_{experiment}/V_{control}$
	Контроль Control	Виразол <sup>23Г</sup> Virazole <sup>23Г</sup>	
2	14,6	10,2	0,7
5	9,5	6,1	0,65
10	3,7	3,6	0,98

Полученные данные полностью подтверждают результаты первичного скрининга действия этих эффекторов на фосфолиполилиз методом гель-диффузии [15].

Количественная оценка фосфолиполиза традиционными методами кинетики затруднена в связи с нерастворимостью субстрата в водной среде, его способностью образовывать надмолекулярные структуры, в которых не все молекулы доступны для фермента. В связи с этим в основу нашего кинетического анализа был положен метод Э. Денниса [14], схема которого описана в экспериментальной части.

ФЛА<sub>2</sub> – фермент, осуществляющий межфазный катализ. Поэтому липолитическая реакция, катализируемая ФЛА<sub>2</sub>, характеризуется двумя константами: константой равновесия образования комплекса фермент-поверхность раздела фаз ( $K_s$ ) и константой Михаэлиса ( $K_m$ ).

В связи с тем, что в структуре молекулы изучаемого соединения имеются гидрофобные (арильные, гетерильные и метильные группы) и гидрофильные (заряженные O, N и Si атомы) составляющие, для выявления взаимосвязи «структура–функция» в проявлении регуляторных свойств Виразол<sup>23Г</sup> по отношению к фосфолиполизу, представляло особый интерес установление типа ингибирования ФЛА<sub>2</sub>.

Как известно, графический метод кинетического анализа в классическом варианте Лайнуивера–Берка позволяет определить в двойных обратных координатах тип ингибирования по взаиморасположению кинетических кривых в отсутствие и в присутствии эффектора. Для конкурентного типа характерно пересечение прямых в одной точке на оси ординат, что свидетельствует об одинаковой максимальной скорости реакции в отсутствие и присутствии эффектора, а также бóльшим углом наклона кривой в присутствии ингибитора по сравнению с контролем, то есть  $K_{mi} > K_m$ . При неконкурентном ингибировании прямые пересекают ось ординат в разных точках и сходятся в одной точке на оси ординат в левом верхнем квадранте графика [18].

При этом конкурентный тип ингибирования, учитывая особенности двухстадийного взаимодействия ФЛА<sub>2</sub> с субстратом, указывал бы на связывание эффектора с каталитическим центром фермента, характеризуемым  $K_m$ , неконкурентный или смешанный тип – свидетельствовал бы о препятствии взаимодействию ФЛА<sub>2</sub> с межфазной поверхностью «липид–вода», характеризуемому  $K_s$ . В первом случае Виразол<sup>23Г</sup> стал бы привлекательным для дальнейшего исследования в качестве нового противовоспалительного антипанкреатитного средства.

Для изучения типа ингибирования фосфолиполиза скорость реакции рассчитывали, согласно схеме 1 по уравнению

$$v = \frac{V_{\max}BA}{K_sK_m + K_mA + BA}, \quad (1)$$

где  $v$  – начальная скорость реакции;  $V_{\max}$  – максимальная скорость реакции;  $A$  – общая концентрация фосфолипида и детергента в объеме (мМ);  $B$  – концентрация фосфолипида на поверхности раздела фаз (молярная доля).

Определение кинетических констант при начальных скоростях реакции (до 2 мин) осуществляли в системе, в которой концентрация фосфолипида в составе межфазной поверхности смешанных мицелл в пределах каждой зависимости (кривой) поддерживалась постоянной ( $[B] = \text{const}$ ), тогда как общая концентрация мицеллярных центров связывания фермента ( $[A]$ ) изменялась. В этом случае уравнение зависимости  $1/v$  от  $1/A$ , производное от (1) в двойных обратных координатах, на основании которого рассчитывались параметры реакции, имеет вид

$$\frac{1}{v} = \left[ \frac{K_s K_m}{V_{\max} B} \right] \frac{1}{A} + \frac{1}{V_{\max}} \left[ 1 + \frac{K_m}{B} \right], \quad (2)$$

а зависимость  $1/v$  от  $1/A$  из уравнения (2) прямолинейна. Мицелла рассматривается как кинетический аналог кофактора, который не изменяется в процессе реакции.

На первом этапе исследования определяли начальную скорость реакций для каждого значения  $A$  (схема 1) при оптимальном времени (до 2 мин), соответствующем, как традиционно принято в кинетических исследованиях [18], половине прямолинейного участка на кривой зависимости степени гидролиза субстрата под действием ФЛА<sub>2</sub> от продолжительности реакции с экстракцией продуктов фосфолиполиза через 2, 5, 10 и 30 мин. На рис. 2 на примере исходной реакции со значением  $A$  (ФХ + ДОХ) = 3,0 мМ,  $B = 0,33$  (ФХ : ДОХ = 1 : 2) представлен способ вычисления на первичном графике координаты каждой точки (скорости реакции), использованной для построения вторичных графиков зависимости  $1/V$  от  $1/A$  на рис. 3 и 4.

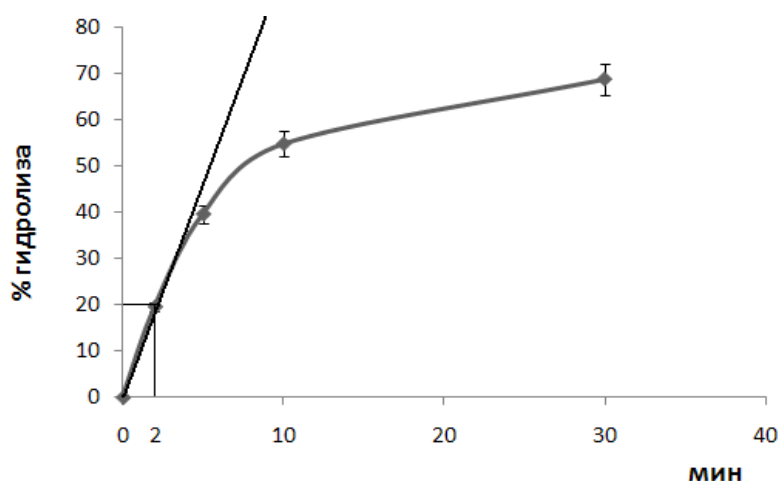


Рис. 2. Зависимость степени гидролиза субстрата под действием ФЛА<sub>2</sub> от продолжительности реакции

Fig. 2. Dependence of the hydrolysis degree of the substrate under the action of PLA<sub>2</sub> on the reaction time

Конечные данные кинетики реакции гидролиза ФХ в смешанных мицеллах, катализируемой ФЛА<sub>2</sub>, с использованием рассчитанных скоростей реакции, при переменной  $[A]$  и постоянной  $[B]$  представлены на рис. 3 и 4. Для всех четырех значений  $B$  (при соотношениях ФХ : ДОХ 1 : 2, 1 : 5, 1 : 7 и 1 : 11) удается однозначно провести прямые линии через экспериментальные точки. Прямые линии пересекаются в одной точке в левом квадранте графика с координатами, равными  $1/K_s$ ,  $1/V$  и отсекают от оси ординат отрезки (отсечки), равные  $1/v$  при  $A \rightarrow \infty$  (рис. 3). Вторично построенная зависимость этих отсечек от  $1/B$ , представленная на рис. 5 (контроль), также прямолинейна и пересекает ось абсцисс в точке  $1/B = -1/K_m$ , а ось ординат в точке  $1/V = 1/V_{\max}$ . Последний график (рис. 5) соответствует классической зависимости  $1/V$  от  $1/S$  Лайнуивера–Берка [14; 18].

Полная доступность для фермента всех молекул субстрата в мицеллярной фазе позволяет количественно охарактеризовать согласно схеме 1 как стадию связывания фермента с поверхностью раздела «липид–вода» ( $K_s = k_{-1}/k_1$ ), так и каталитическую стадию ( $K_m = (k_{-2} + k_3)/k_2$ ), а также установить, на какой из них проявляется действие ингибитора ( $K_i = ([E][I])/[EI]$ ) (рис. 5).

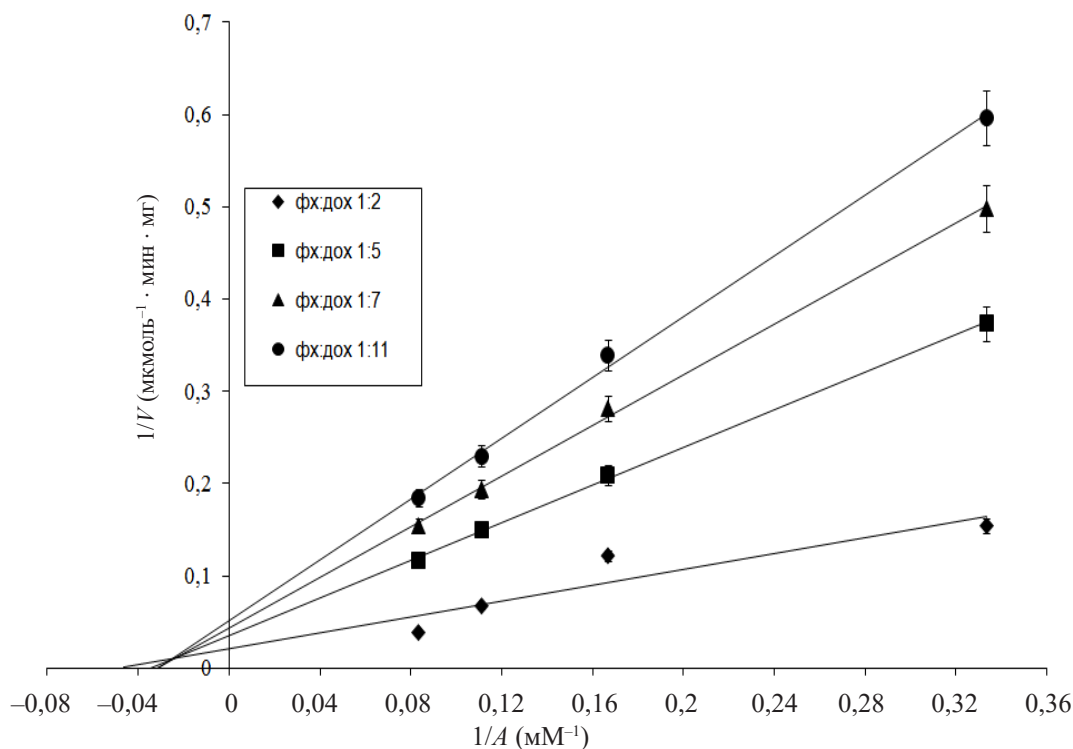


Рис. 3. Зависимость в двойных обратных координатах скорости гидролиза ФХ под действием ФЛА<sub>2</sub> (10 мкг/мл) от суммарной молярной концентрации фосфолипида и детергента при гидролизе смешанных мицелл ФХ : ДОХ–Na

Fig. 3. Dependence of the phosphatidylcholine hydrolysis reaction in the double reciprocal coordinates under the action of PLA<sub>2</sub> (10 µg/ml) on the total molar concentration of phospholipid and detergent at hydrolysis of mixed micelles of phosphatidylcholine: sodium deoxyhalate – Na

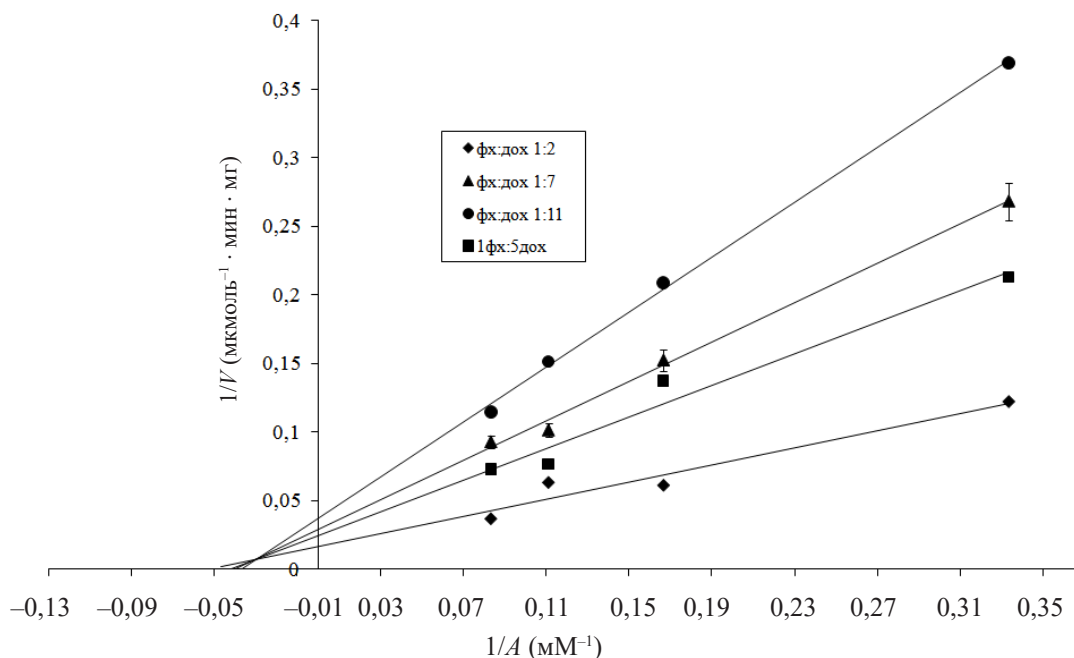


Рис. 4. Зависимость в двойных обратных координатах скорости гидролиза ФХ под действием ФЛА<sub>2</sub> (10 мкг/мл) от суммарной молярной концентрации фосфолипида и детергента при гидролизе смешанных мицелл ФХ : ДОХ–Na в присутствии 0,5 мМ Виразол<sup>23Г</sup>

Fig. 4. Dependence of the phosphatidylcholine hydrolysis reaction in the double reciprocal coordinates under the action of PLA<sub>2</sub> (10 µg/ml) on the total molar concentration of phospholipid and detergent at hydrolysis of mixed micelles of phosphatidylcholine: sodium deoxyhalate – Na in the presence of 0.5 mM Virazole<sup>23Г</sup>

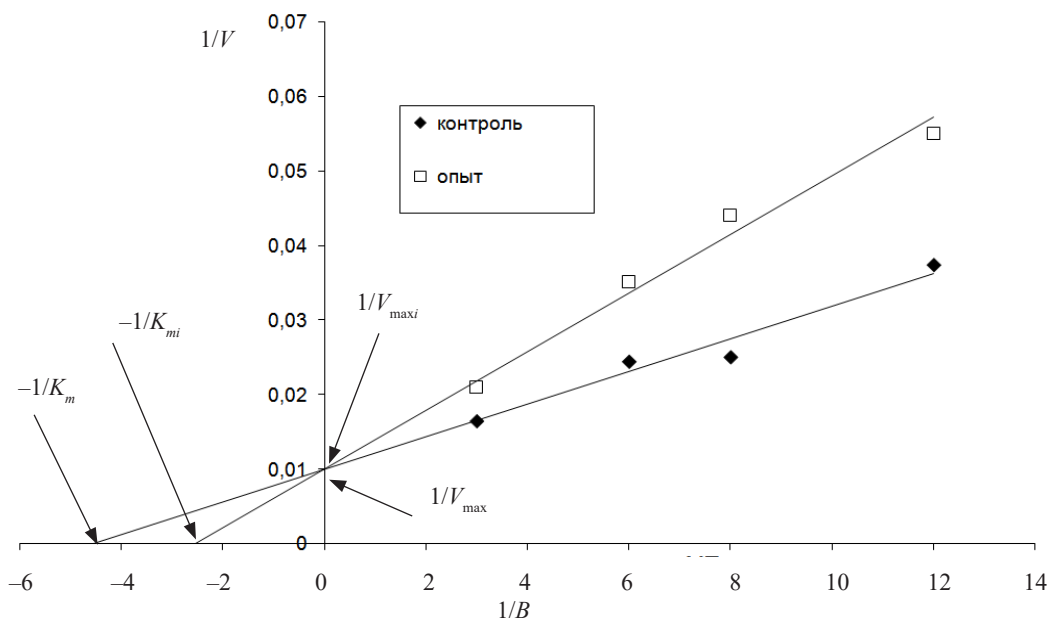


Рис. 5. Зависимость в двойных обратных координатах скорости гидролиза ФХ ( $1/V$  при  $A \rightarrow \infty$ ) под действием ФЛА<sub>2</sub> (10 мкг/мл) от мольной доли липида в составе смешанных мицелл ФХ : ДХ–Na ( $1/B$ ) в присутствии (опыт) и отсутствие (контроль) Виразол<sup>23Г</sup>

Fig. 5. Dependence of the phosphatidylcholine hydrolysis reaction in the double reciprocal coordinates ( $1/V$  at  $A \rightarrow \infty$ ) under the action of PLA<sub>2</sub> (10  $\mu\text{g/ml}$ ) on the molar fraction of lipid as part of mixed micelles of phosphatidylcholine: sodium deoxyhalate – Na ( $1/B$ ) in the presence (experiment) and in the absence (control) of Virazole<sup>23Г</sup>

Сравнивая на рис. 5 вторичные зависимости  $1/V$  от  $1/B$ , выведенные из зависимости  $1/(V)_A$  от  $1/A$  в присутствии ингибитора (рис. 4) и без него (рис. 3) видно, что в первом случае тангенс угла наклона (угловой коэффициент) полученной прямой больше, чем во втором, а точка пересечения с осью  $1/V$  остается неизменной, т. е.  $V_{\max} = V_{\max i}$  ( $1,0 \cdot 10^2$  мкмоль  $\cdot$  мин<sup>-1</sup>  $\cdot$  мг<sup>-1</sup>). Этот факт свидетельствует о том, что наблюдаемое ингибирование носит конкурентный характер. Исходя из этого, поскольку угловой коэффициент для заторможенной реакции (опыт) больше угла наклона незаторможенной реакции (контроль) в  $(1 + [I]/K_i)$  раз, рассчитали величину константы ингибирования,  $K_i = 6,5 \cdot 10^{-4}$  М [17; 18].

Значения рассчитанных из графиков на рис. 3–5 констант равновесия образования комплекса фермент–поверхность раздела фаз ( $K_s$ ) и констант Михаэлиса ( $K_m$ ) и скоростей реакции в присутствии и отсутствие ингибитора приведены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. Значения кинетических параметров в присутствии ингибитора Виразол<sup>23Г</sup> и без него

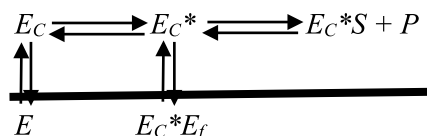
Table 2. Values of the kinetic parameters in the presence of the inhibitor Virazole<sup>23Г</sup> and without it

С Виразол <sup>23Г</sup>		Без Виразол <sup>23Г</sup>	
$-1/K_s$	-0,03	$-1/K_{si}$	-0,03
$1/V_{\max}$	0,01	$1/V_{\max i}$	0,01
$K_s$	33 мМ	$K_{si}$	33 мМ
$K_m$	0,22 мМ	$K_{mi}$	0,39 мМ
$K_i = C_i / (K_{mi} / (K_m - 1))$ 0,65 мМ			

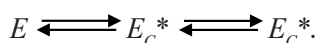
Сравнение значений констант реакций в присутствии ингибитора ( $K_{mi} = 3,9 \cdot 10^{-4}$  М,  $K_{si} = 3,3 \cdot 10^{-2}$  М) и без него ( $K_m = 2,2 \cdot 10^{-4}$  М,  $K_s = 3,3 \cdot 10^{-2}$  М), полученных из данных, представленных на рис. 3 и 4, показывает, что  $K_m$  увеличилась в 1,8 раз, а константа равновесия образования комплекса фермент–мицелла не изменяется, что свидетельствует о действии эффектора на каталитически значимый участок активного центра панкреатической ФЛА<sub>2</sub>.



Общая модель гидролиза ФЛА<sub>2</sub> субстратов, находящихся на границе раздела фаз, согласно [21], реализуется следующим образом:



Полагают, что фермент ( $E$ ) из раствора связывается на поверхности раздела фаз и может находиться в конформациях ( $E_C$  и  $E_C^*$ ) с малой и высокой ферментативной активностью. Равновесие между этими двумя формами определяется свойствами как фермента, так и поверхности раздела фаз. Различия в ферментативной активности ФЛА<sub>2</sub> объясняются сдвигом равновесий [21]:



Таким образом, в присутствии эффектора ( $E_f$ ) происходит, вероятнее всего, конкуренция с субстратом за связывание в активном центре фермента и уменьшение образования продукта реакции. Увеличение  $K_m$  в 1,8 раза в присутствии липофильного производного виразола (Виразол<sup>23Г</sup>) наряду с неизменившимся значением  $V_{max}$  показывает, что данное соединение является ингибитором ФЛА<sub>2</sub> с умеренным конкурентным действием ( $K_i = 6,5 \cdot 10^{-4}$  М), сравнимым по эффекту торможения фосфолиполиза с некоторыми наиболее сильными аминокислотными производными ФХ ( $K_i = 5,4 \cdot 10^{-4}$  М...  $8,0 \cdot 10^{-4}$  М [22]). Причем, конкуренция между субстратом и эффектором идет за связывание с каталитическим центром фермента. Неизменность константы связывания с поверхностью раздела фаз в присутствии эффектора свидетельствует об отсутствии торможения распада комплекса фермент–мицелла.

**Заключение.** В результате проведенного исследования установлено, что Виразол<sup>23Г</sup> ингибирует панкреатическую ФЛА<sub>2</sub> в эквимольной концентрации с ФХ (0,5 мкмоль/л) в мицеллярной фазе.

Впервые количественно охарактеризованы обе стадии фосфолиполиза в модельных физиологических условиях: связывания фермента на поверхности раздела фаз «липид–вода» и непосредственно каталитический акт с определением соответствующих кинетических констант ( $K_s$  и  $K_m$ ), а также максимальной скорости реакции ( $V_{max}$ ). Используя метод Э. Денниса, адекватно описывающий двухэтапный фосфолиполиз, показано, что Виразол<sup>23Г</sup> не влияет на величину  $K_s$ , но почти вдвое увеличивает значение  $K_m$  при неизменности  $V_{max}$ . Кинетические параметры реакции свидетельствуют в пользу конкурентного механизма ингибирования Виразол<sup>23Г</sup> панкреатической ФЛА<sub>2</sub> ( $K_i = 65$  мМ).

На основании полученных результатов можно предположить, что необходимым условием для проявления ингибиторного действия Виразол<sup>23Г</sup> является наличие в молекуле эффектора *трет*-бутилдиметилсиланилокси группы. Принимая во внимание, что атом кремния в Виразол<sup>23Г</sup> экранирован пятью гидрофобными метильными группами, более определенные выводы о роли этого атома в наблюдаемых эффектах можно будет сделать после сравнительного ингибиторного анализа Виразол<sup>23Г</sup>, в котором атом кремния заменен на атом углерода. Очевидно, что две объемных гидрофобных группировки в молекуле Виразол<sup>23Г</sup> также вносят значительный вклад в наблюдаемые эффекты.

В заключение следует отметить, что полученные результаты говорят о перспективности поиска активных антипанкреатитных соединений в ряду про-лекарств (pro-drugs) нуклеозидной природы.

**Благодарности.** Автор благодарит канд. хим. наук Д. О. Герловского за помощь в осуществлении предложенного для этой работы эксперимента. Работа выполнена в рамках отдельного проекта фундаментальных и прикладных научных исследований НАН Беларуси (ПБП № 116-12-032019).

**Acknowledgments.** The author is grateful to Ph. D. (Chemistry) D. O. Gerlovsky for assistance in conducting the experiment for the present work. The work has been done within the framework of a separate Project of Fundamental and Applied Research of the NAS of Belarus (ПБП No. 116-12-032019).

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Murakami, M. Novel functions of phospholipase A<sub>2</sub>: 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>
2. Tappia, P. S. Phospholipases in Health and Disease / P. S. Tappia, N. S. Dhalla. – New York, 2014. – 410 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0464-8>
3. Small-molecule inhibitors as potential therapeutics and as tools to understand the role of phospholipases A<sub>2</sub> / A. Nikolaou [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2019. – Vol. 1864, N 6. – P. 941–956. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.08.009>
4. Synthesis of new secretory phospholipase A<sub>2</sub>-inhibitory indole containing isoxazole derivatives as anti-inflammatory and anticancer agents / S. R. Pedada // *Eur. J. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 112. – P. 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.02.025>
5. Discovery of AZD2716: a novel secreted phospholipase A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>) inhibitor for the treatment of coronary artery disease / F. Giordanetto [et al.] // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2016. – Vol. 7, N 10. – P. 884–889. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.6b00188>
6. Development of a potent 2-oxoamide inhibitor of secreted phospholipase A<sub>2</sub> guided by molecular docking calculations and molecular dynamics simulations / S. Vasilakaki [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 24, N 8. – P. 1683–1695. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.02.040>
7. New quinoxalinone inhibitors targeting secreted phospholipase A<sub>2</sub> and  $\alpha$ -glucosidase / F. Alasmay [et al.] // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* – 2017. – Vol. 32, N 1. – P. 1143–1151. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1363743>
8. Dual role of protein kinase C in the regulation of cPLA<sub>2</sub>-mediated arachidonic acid release by P2U receptors in MDCK–D1 cells: involvement of MAP kinase-dependent and -independent pathways / M. Xing [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1997. – Vol. 99, N 4. – P. 805–814. <https://doi.org/10.1172/jci119227>
9. Regulation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> in rat endometrial stromal cells: the role of epidermal growth factor / V. M. Bany [et al.] // *Mol. Reprod. Dev.* – 1999. – Vol. 52, N 4. – P. 335–340. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2795\(199904\)52:4%3C335::aid-mrd1%3E3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2795(199904)52:4%3C335::aid-mrd1%3E3.0.co;2-f)
10. Литвинко, Н. М. Комплексообразование фосфолипазы A<sub>2</sub> с фрагментами нуклеиновых кислот и способы их устранения / Н. М. Литвинко, А. П. Дрожженюк // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 1996. – Т. 32, № 6. – С. 650–655.
11. Действие фосфолипаз на химерные субстраты, созданные на основе фосфолипидов и компонентов нуклеиновых кислот / Н. М. Литвинко [и др.] // *Докл. Акад. наук Беларуси*. – 2005. – Т. 49, № 4. – С. 70–73.
12. Фосфодиэфирные производные ацикловира – новые ингибиторы панкреатической фосфолипазы A<sub>2</sub> / Д. О. Герловский [и др.] // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси*. – 2010. – Т. 54, № 1. – С. 75–82.
13. Inhibition of secretory phospholipase A<sub>2</sub>. 1-Design, synthesis and structure–activity relationship studies starting from 4-tetradecyloxybenzamide to obtain specific inhibitors of group II sPLA<sub>2</sub>s / 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>
14. Deems, R. A. Kinetic analysis of phospholipase A<sub>2</sub> 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. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)40687-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)40687-x)
15. Влияние производных рибавирина на катализ липолитических реакций / Н. М. Литвинко [и др.] // *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: сб. науч. тр. IX съезда Белорус. обществ. объединения фотобиологов и биофизиков, 23–25 июня 2010 г.* – Минск, 2010. – С. 240–242.
16. Бергельсон, Л. Д. Препаративная биохимия липидов / Л. Д. Бергельсон, Э. В. Дятловицкая, Ю. Г. Молотковский. – М., 1981. – 259 с.
17. Vaskovsky, V. E. A universal reagent for phospholipid analysis / V. E. Vaskovsky, E. Y. Kostetsky, I. M. Vasendin // *Journal of Chromatography*. – 1975. – Vol. 114, N 1. – P. 129–141. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)85249-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)85249-8)
18. Уэбб, Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма / Л. Уэбб. – М., 1966. – 730 с.
19. Рахуба, Г. Н. Липолитические реакции с участием фосфолипазы A<sub>2</sub> и механизмы их регуляции по принципу обратной связи / Г. Н. Рахуба. – Минск, 2007. – 143 л.
20. Активность ФЛА<sub>2</sub> в присутствии модифицированных аналогов нуклеозидов / А. В. Лях [и др.] // *Материалы Междунар. науч.-практ. конф. «Биотехнологии микроорганизмов», посвящ. проф. Ю. К. Фомичеву (1929–2015)*. – Минск, 2019. – С. 368–370.
21. Verheij, H. M. Chemical Modification of the alpha–Amino Group in Snake Venom Phospholipases A<sub>2</sub>. A Comparison of the Interaction of Pancreatic and Venom Phospholipases with Lipid–Water Interfaces / H. M. Verheij, M. R. Egmond, G. H. De Haas // *Biochemistry*. – 1981. – Vol. 20, N 1. – P. 94–99. <https://doi.org/10.1021/bi00504a016>
22. Липидные ингибиторы фосфолипазы A<sub>2</sub> / Н. А. Брагина [и др.] // *Биорг. химия*. – 1999. – Т. 25, № 2. – С. 83–96.

## References

1. Murakami M. Novel functions of phospholipase A<sub>2</sub>: Overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2019, vol. 1864, no. 6, pp. 763–765. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.02.005>
2. Tappia P. S., Dhalla N. S. *Phospholipases in Health and Disease*. New York, 2014. 410 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0464-8>
3. Nikolaou A., Kokotou M. G., Vasilakaki S., Kokotos G. Small-molecule inhibitors as potential therapeutics and as tools to understand the role of phospholipases A<sub>2</sub>. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2019, vol. 1864, no. 6, pp. 941–956. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.08.009>

4. Pedada S. R., Yarla N. S., Tambade P. J., Dhananjaya B. L., Bishayee A., Arunasree K. M., Philip G. H., Dharmapuri G., Aliev G., Putta S., Rangaiah G. Synthesis of new secretory phospholipase A<sub>2</sub>-inhibitory indole containing isoxazole derivatives as anti-inflammatory and anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, vol. 112, pp. 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.02.025>
5. Giordanetto F., Pettersen D., Starke I., Nordberg P., Knerr L., Selmi N., Rosengren B., Larsson L.-O., Sandmark J., Castaldo M., Dekker N., Karlson U., Hurt-Camejo E. Discovery of AZD2716: a novel secreted phospholipase A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>) inhibitor for the treatment of coronary artery disease. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2016, vol. 7, no. 10, pp. 884–889. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.6b00188>
6. Vasilakaki S., Barbayianni E., Leonis G., Papadopoulos M. G., Mavromoustakos T., Gelb M. H., Kokotos G. Development of a potent 2-oxoamide inhibitor of secreted phospholipase A<sub>2</sub> guided by molecular docking calculations and molecular dynamics simulations. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2016, vol. 24, no. 8, pp. 1683–1695. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.02.040>
7. Alasmary F., Alnahdi F. S., Bacha A. B., El-Araby A. M., Moubayed N., Alafeefy A. M., El-Araby M. E. New quinoxalinone inhibitors targeting secreted phospholipase A<sub>2</sub> and α-glucosidase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2017, vol. 32, no. 1, pp. 1143–1151. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1363743>
8. Xing M., Firestein B. L., Shen G. H., Insel P. A. Dual role of protein kinase C in the regulation of cPLA<sub>2</sub>-mediated arachidonic acid release by P2U receptors in MDCK–D1 cells: involvement of MAP kinase-dependent and -independent pathways. *Journal of Clinical Investigation*, 1997, vol. 99, no. 4, pp. 805–814. <https://doi.org/10.1172/jci119227>
9. Bany B. M., Schultz G. A., Kennedy T. G. Regulation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> in rat endometrial stromal cells: the role of epidermal growth factor. *Molecular Reproduction and Development*, 1999, vol. 52, no. 4, pp. 335–340. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2795\(199904\)52:4%3C335::aid-mrd1%3E3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2795(199904)52:4%3C335::aid-mrd1%3E3.0.co;2-f)
10. Litvinko N. M., Drozhdenok A. P. Complexation of phospholipase A<sub>2</sub> with nucleic acid fragments and methods for their elimination. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* [Applied Biochemistry and Microbiology], 1996, vol. 32, no. 6, pp. 650–655 (in Russian).
11. Litvinko N. M., Kuchuro S. V., Rakhuba G. N., Skorostetskaya L. A., Kalinichenko E. N., Zhernosek E. V. Effect of phospholipases on chimeric substrates based on phospholipids and nucleic acid components. *Doklady Akademii nauk Belarusi = Doklady of the Academy of Sciences of Belarus*, 2005, vol. 49, no. 4, pp. 70–73 (in Russian).
12. Gerlovsky D. O., Litvinko N. M., Skorostetskaya L. A., Kuchuro S. V., Kalinichenko E. N., Farina A. V. Phosphodiester of acyclovir – new inhibitors of pancreatic phospholipase A<sub>2</sub>. *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).
13. Assogba L., Ahamada-Himidi A., Meddad-Bel Habich N., Aoun D., Boukli L., Massicot F., Mounier C. M., Huet J., Lamouri A., Ombetta J.-E., Godfroid J.-J., Dong C.-Z., Heymans F. Inhibition of secretory phospholipase A<sub>2</sub>. 1-Design, synthesis and structure–activity relationship studies starting from 4-tetradecyloxybenzamidines to obtain specific inhibitors of group II sPLA<sub>2</sub>s. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2005, vol. 40, no. 9, pp. 850–861. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2005.03.027>
14. Deems R. A., Eaton B. R., Dennis E. A. Kinetic analysis of phospholipase A<sub>2</sub> 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. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)40687-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)40687-x)
15. Litvinko N. M., Gerlovsky D. O., Kuchuro S. V., Kalinichenko E. N., Kulak T. I., Oleinikova I. A. Effect of ribavirin derivatives on catalysis of lipolytic reactions. *Molekulyarnye, membrannye i kletochnye osnovy funkcionirovaniya biosistem: sbornik nauchnykh trudov IX s'ezda Belorusskogo obshchestvennogo ob'edineniya fotobiologov i biofizikov, 23–25 iyunya 2010 g.* [Molecular, membrane and cellular bases of the functioning of biosystems: collection of scientific papers of the IX Congress of the Belarusian Public Association of Photobiologists and Biophysicists, June 23–25, 2010]. Minsk, 2010, pp. 240–242 (in Russian).
16. Bergelson L. D., Dyatlovitskaya E. V., Motolkovski Yu. G. *Preparative biochemistry of lipids*. Moscow, 1981 (in Russian).
17. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin I. M. A universal reagent for phospholipid analysis. *Journal of Chromatography*, 1975, vol. 114, no. 1, pp. 129–141. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)85249-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)85249-8)
18. Webb L. *Enzyme and metabolic inhibitors*. Academic Press, 1963. 1028 p. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.7320>
19. Rakhuba G. N. *Lipolytic reactions with the participation of phospholipases A<sub>2</sub> and mechanisms of their regulation according to the principle of feedback*. Minsk, 2007. 143 p. (in Russian).
20. Lyakh A. V., Litvinko N. M., Mikhailopulo I. A., Gerlovsky D. O. PLA<sub>2</sub> Activity in the Presence of Modified Nucleoside Analogs. *Materialy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii «Biotekhnologii mikroorganizmov», posvyashchennoi professoru Yu. K. Fomichevu (1929–2015)* [Materials of the International Scientific and Practical Conference “Biotechnology of Microorganisms” dedicated to Professor Yu. K. Fomichev (1929–2015)]. Minsk, 2019, pp. 368–370 (in Russian).
21. Verheij H. M., Egmond M. R., De Haas G. H. Chemical Modification of the alpha-Amino Group in Snake Venom Phospholipases A<sub>2</sub>. A Comparison of the Interaction of Pancreatic and Venom Phospholipases with Lipid–Water Interfaces. *Biochemistry*, 1981, vol. 20, no. 1, pp. 94–99. <https://doi.org/10.1021/bi00504a016>
22. Bragina N. A., Chupin V. V., Bulgakov V. G., Shalnev A. N. Lipid inhibitors of phospholipase A<sub>2</sub>. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 1999, vol. 25, no. 2, pp. 67–80.

#### Информация об авторе

Литвинко Наталья Михайловна – д-р хим наук, доцент, заведующая лабораторией. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: al\_h@mail.ru.

#### Information about the author

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