



УДК 577.152.31*14:577.352(2+3):576.385.2

ЛИПИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ФОСФОЛИПАЗЫ A₂

© 1999 г. Н. А. Брагина[#], В. В. Чупин, В. Г. Булгаков*, А. Н. Шальнев*

Московская государственная академия тонкой химической технологии
им. М.В. Ломоносова, 117571, Москва, просп. Вернадского, 86;

* Центральный институт травматологии и ортопедии МЗ России, Москва

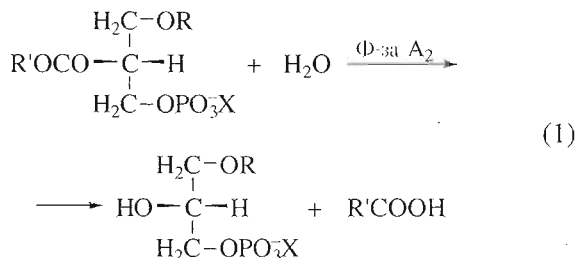
Поступила в редакцию 02.02.98 г. Принята к печати 23.04.98 г.

Обобщены литературные данные об основных типах липидных ингибиторов фосфолипазы A₂. Представлены сведения о субстратной специфичности, особенностях кинетики межфазного катализа, методах определения активности фермента, а также биологической роли внутриклеточных фосфолипаз A₂. Обсуждаются возможности применения ингибиторов липидной природы для регулирования активности фермента при патологических процессах в организме.

Ключевые слова: фосфолипаза A₂; ингибиторы; фосфолипиды; метаболиты арахидоновой кислоты; фактор активации тромбоцитов (ФАТ).

ВВЕДЕНИЕ

Фосфолипаза A₂ представляет собой липолизический фермент (КФ 3.1.1.4), который специфически расщепляет сложноэфирную связь в *sn*-2-положении фосфоглицеридов:



R – остаток высшей жирной кислоты, альдегида или спирта,
X – остаток холина, этаноламина, серина, инозита и др.,
R' – алкильный остаток.

Фосфолипазы A₂ широко распространены в природе и существуют в секретируемой и внутриклеточной формах. К секретируемому фосфолипазам A₂ относят ферменты ядов рептилий, членистоногих и кишечнополостных, пищеварительные ферменты млекопитающих [1].

Внутриклеточным фосфолипазам A₂ долгое время не уделялось должного внимания из-за сложности их выделения, идентификации и очистки, связанных с их низкой концентрацией в животных клетках. В настоящее время данным ферментам отводится важная роль в катаболизме

клеточных фосфолипидов и поддержании структурной целостности клеточных мембран [2]. Кроме того, клеточные фосфолипазы A₂ привлекают исследователей благодаря своей способности высвобождать арахидоновую кислоту. Основной запас этой кислоты в клетках млекопитающих сосредоточен по *sn*-2-положению глицерофосфолипидов. Арахидоновая кислота, высвобожденная под действием фосфолипазы A₂, служит предшественником для биосинтеза эйкозаноидов: лейкотриенов, тромбоксанов, простагландина и простагландинов [3]. Другим продуктом реакции расщепления фосфолипидов под действием фосфолипазы A₂ является лизофосфолипид. Если субстратом фермента выступает 1-*O*-алкил-2-ацил-*sn*-глицеро-3-фосфолин, то лизофосфолипид служит предшественником фактора активации тромбоцитов (ФАТ) [4]. В настоящее время полагают, что высвобождение арахидоновой кислоты и лизофосфолипида – это процесс, контролирующий образование эйкозаноидов и ФАТ. Последние являются важными биологическими медиаторами не только нормальных физиологических процессов, но и патологических состояний, таких как воспалительные, аллергические и анафилактические реакции, септический шок, астматический статус и др. [5]. В связи с этим поиск, синтез и использование специфических ингибиторов фосфолипаз A₂, кроме всего прочего, представляют фармакологический интерес. Однако до сих пор не ясно, какие именно клеточные фосфолипазы A₂ вовлечены в конкретные процессы, так как животные клетки содержат фосфолипазы A₂ как с низкой (14 кДа), так и с высокой молекулярной массой (60–110 кДа).

В качестве моделей для изучения механизма действия малодоступных внутриклеточных фос-

Сокращения: Cho – холин; Etn – этаноламин; P – остаток фосфорной кислоты; Grog – глицерин; Gl – гликоль.

[#] Автор для переписки (тел.: 434-85-44; факс: +7(095) 430-7983).

фолипаз A_2 служат секретлируемые ферменты ядов и панкреатических желез млекопитающих. Важной стороной таких исследований является синтез и использование конкурентных ингибиторов липидной природы для изучения взаимодействий фермент/субстрат, а в перспективе – и для возможного клинического применения.

1. СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Катализ под действием фосфолипазы A_2 характеризуется поверхностной, позиционной и стерической специфичностью фермента. Фосфолипаза A_2 катализирует реакцию (1) на поверхности раздела липид/вода. С одной стороны, для большинства липолитических ферментов, включая и фосфолипазу A_2 , активность фермента оказывается значительно выше при существовании субстратов в форме агрегатов (мицелл, смешанных мицелл, монослоев и бислоев), чем при действии на водорастворимые субстраты в мономолекулярной форме [6, 7].

С другой стороны – фосфолипаза A_2 не действует на липидные молекулы в составе плотно упакованных и, следовательно, труднодоступных липидных агрегатов. Для создания поверхности раздела фаз в этих случаях обычно используют детергенты (Тритон X-100, дезоксихолат натрия). Доказано, что для оптимального проявления поверхностной специфичности фермента необходимо наличие агрегированных субстратов с определенной длиной ацильной цепи [6, 8].

С обнаружением стерической и позиционной специфичности фосфолипаз A_2 были сформулированы довольно строгие минимальные требования фермента к субстрату: в положении *sn*-2 глицеринового остатка липид должен содержать сложноеэфирную группу, а в положении *sn*-3 – фосфатную [9]. Позднее было показано, что остаток фосфорной кислоты может быть замещен сульфониевым: сульфоллипид оказался хорошим субстратом фосфолипазы A_2 [10]. Соответствующие фосфолипиды, где связь C–O–P замещена на связь C–P, также гидролизуются ферментом, но в меньшей степени [10]. Поэтому минимальные требования фермента к субстрату в настоящее время сводят к тому, чтобы глицерофосфолипид обладал природной L-конфигурацией и имел сложноеэфирную связь в *sn*-2-положении глицерина, а также содержал на расстоянии пяти-шести атомов от карбоксильного углерода группу с сильными анионными свойствами. Считается, что фосфатная группа должна иметь одну свободную кислотную функцию [10].

В фосфолипиде с двумя чувствительными сложноеэфирными связями – дифосфатидилглицерине (кардиолипине) – гидролизуются могут обе [1, 10]. Было установлено, что β-лецитины

(1,3-диацил-*sn*-глицеро-2-фосфохолины) гидролизуются фосфолипазой A_2 из яда змеи *Crotalus adamanteus*, хотя и со сравнительно низкой скоростью [9, 10]. Фосфолипаза A_2 не гидролизует амидную связь сфинголипидов [9, 11]. Тиоловые аналоги фосфатидилхолинов являются хорошими субстратами, что позволяет следить за процессом гидролиза спектрофотометрически [12]. Де Хаас и др. установили, что отрицательный заряд на фосфатной группе не является абсолютным требованием к субстрату [13].

Благодаря стерической и позиционной специфичности, фосфолипазы A_2 – ценный инструмент в химии и биохимии липидов. Их используют для установления позиционного распределения жирных кислот при анализе фосфоглицеридов, для разделения рацемических смесей липидов, а также в синтезе липидов для получения фосфоглицеридов со смешанным составом жирных кислот [1].

Субстратная специфичность клеточных фосфолипаз A_2 до сих пор еще полностью не очерчена, однако накоплены данные относительно строения субстратов для фосфолипаз A_2 клеток крови и иммунной системы, в частности, доказана специфичность этих ферментов к фосфатидилхолинам, содержащим в *sn*-2-положении глицерина арахионат [14–20].

2. КИНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФОСФОЛИПАЗ A_2 С СУБСТРАТАМИ

К настоящему времени достаточно полно изучены кинетические зависимости для большого числа водорастворимых ферментов, включая эстеразы, действующих на мономерные субстраты. Как правило, эти реакции подчиняются уравнению стационарной кинетики Михаэлиса–Ментен [1].

Фосфолипазы A_2 принадлежат к особой группе ферментов, чья специфическая активность находится в зависимости от формы агрегации субстрата. Скорость гидролиза фосфолипидов увеличивается на несколько порядков при переходе субстрата от мономолекулярной дисперсионной формы к мицеллярной [6, 7]. Однако до сих пор неизвестен механизм, в соответствии с которым происходит резкое увеличение скорости ферментативного гидролиза липидов на межфазной поверхности липид/вода. Для объяснения такого всплеска ферментативной активности выдвинут ряд гипотез [7, 10, 21, 22]. Джейн и др. предложили модель межфазного катализа для фосфолипазы A_2 (схема 1) [23], в которой стадия равновесия $E \rightleftharpoons E^*$ является ключевой. Принимают, что каталитическое действие совершается в две стадии:

1) фермент, находящийся в водной фазе (E), присоединяется к межфазной поверхности агрегированного субстрата;

2) фермент на межфазной поверхности (E*) связывается с молекулой субстрата, образуется комплекс E*S, который распадается с образованием продуктов ферментативной реакции. Затем E* возвращается в водную фазу (E) или связывается со следующей молекулой субстрата на межфазной поверхности.

Полная скорость каталитического цикла определяется не только кинетикой реакций, которые происходят на межфазной поверхности, но также равновесием и кинетикой реакций связывания и десорбции фермента с этой поверхностью. Математическое описание некоторых моделей, соответствующих схеме 1, приводится в работах [7, 23].

Для объяснения феномена межфазного связывания и каталитической функции данного фермента предполагают, что каталитический центр фосфолипазы A₂ функционально и топологически отличается от участка межфазного узнавания, благодаря которому фермент связывается с межфазной поверхностью субстрата. Особенности кинетики гидролиза для определенной межфазной поверхности связаны с относительным вкладом двух различных способов включения фермента E* в каждый последующий каталитический цикл [24] в соответствии с двумя разными механизмами (схема 2) [25, 26]:

1) абсолютная "hopping"-модель катализа. Связывание фермента с межфазной поверхностью E → E* и десорбция связанного фермента в водную среду E*S → E происходит во время каждого каталитического цикла;

2) согласно модели межфазного катализа "scooting", связанный фермент (E*) после образования продуктов гидролиза не покидает межфазную поверхность и диффундирует к следующей молекуле субстрата. Впервые эту модель липолиза выдвинул Тилке в 1978 г., однако лишь недавно удалось экспериментально разделить и охарактеризовать эти две крайние модели липолиза для фосфолипазы A₂ [23, 27].

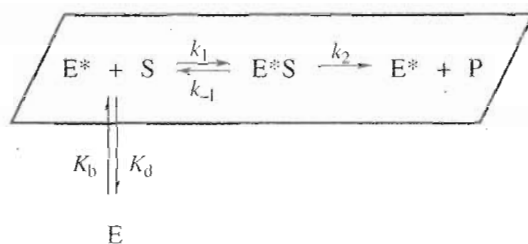


Схема 1.

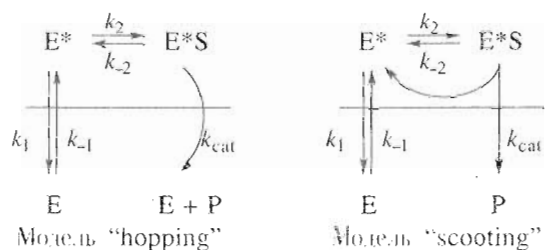


Схема 2.

вание радиоактивно меченных субстратов позволяет измерять удельную активность в пределах 5–10 нмоль/(мин мг), но отсутствие возможности непрерывного контроля из-за трудоемкости и недостаточной эффективности разделения продуктов гидролиза ограничивает сферу применения данного метода [34, 35].

Для оценки высвобождения при гидролизе жирных кислот применялись методы кондуктометрии [36], газожидкостной хроматографии меченых соединений [28], полярографии с одновременным определением активности липоксигеназы [37].

В последние годы получил широкое развитие спектрофотометрический метод измерения активности фосфолипаз A₂ с использованием тиоэфирных аналогов субстратов [12]. Этот метод сочетает в себе все преимущества непрерывного и высокочувствительного методов ферментативного анализа (нижний предел чувствительности 1 нмоль/мин). В ходе гидролиза тиосубстратов открывается SH-группа, реагирующая далее с тиольным реагентом – 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислотой). Концентрация освобождающегося хромогенного аниона 5-тио(2-нитробензоата) измеряется спектрофотометрически (412 нм). Синтезировано большое число хромогенных субстратов фосфолипазы A₂, среди них – тиоаналоги фосфатидилхолинов [12], триглицеридов [38], короткоцепочечных фосфатидилхолинов [39]. Использование оптически активного субстрата (R)-1,2-ди-S-гептаноил-3-O-(фосфохолин)димеркаптопропанола позволило увеличить чувствительность метода до 0,2 нмоль/мин [40]. Был также синтезирован высокоспецифичный субстрат (R)-1,2-ди-O,S-гексадеканойл-3-O-(фосфохолин)мер-

3. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФОСФОЛИПАЗ A₂

К общим методам определения фосфолипазной активности относятся титриметрический [28–30] и радиометрический [31–33]. С появлением автоматического pH-стата стал возможен непрерывный контроль за ходом гидролиза, однако ацидометрический метод относительно малочувствителен (нижний предел определения жирных кислот 50–100 нмоль/мин) и непригоден для анализа внутриклеточных фосфолипаз. Использо-

Таблица 1. Неконкурентные ингибиторы гидролиза под действием панкреатической фосфолипазы A_2 свиньи водных дисперсий, содержащих димиристоил-фосфатидилхолин, 1-пальмитоил-2-лизофосфатидилхолин и пальмитиновую кислоту в мольном соотношении 100 : 22 : 22. Мольная доля ингибитора в смеси – 0.18, температура 30°C [61].

Ингибитор	K_i , мкМ
Метанол	2.46×10^6
Тетрагидрофуран	12.5×10^3
Кетамин	4.5×10^3
Стрептомицин, сульфат	1.6×10^3
Гентамицин, сульфат	1.3×10^3
Хлороформ	780
<i>n</i> -Тетрадеканол	98
Мепакрин	59
<i>транс-n</i> -Тетрадец-9-енол	55
Хлоропромазин	27
<i>цис-n</i> -Тетрадец-9-енол	26

каптопропандиол [41]. Применение данного метода в сочетании с субстратами, содержащими в *sn*-2-положении глицерина арахидоноилтиогруппы, открывает возможности для определения внутриклеточных ферментов [42].

Проводились работы по синтезу фосфолипидных субстратов с флуоресцентными метками в жирнокислотных цепях. Показано, что при использовании 1-ацил-2-паринароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина можно измерять уровень фосфолипазной активности в пределах 1 нмоль/мин [43], а соединения с пиреновой [44–47], нафтилвинильной [48, 49] и дансильной [49, 50] метками обладают еще большей чувствительностью (порядка 10 пмоль/мин). Синтезирован фосфатидилхолин с дабсильной меткой [49, 50], позволяющий визуально наблюдать за ходом реакции (порог чувствительности для спектрофотометрического анализа 20 пмоль/мин). Использование для контроля за активностью фосфолипазы A_2 окрашенных субстратов и субстратов, имеющих флуоресцентную метку в гидрофобной [43–51] и гидрофильной области молекулы липида [52], представляет альтернативу радиометрическому методу: при одинаковой чувствительности методы с использованием флуоресцентных и окрашенных субстратов проще, менее трудоемки и требуют меньших затрат времени. Однако их недостатком является отсутствие возможности непрерывного контроля за ходом гидролиза и абсолютной специфичности в случае смеси ферментов.

Для оценки взаимодействия фосфолипазы A_2 с мембраноподобными структурами субстратов применяют методы ^{13}C - и ^{31}P -ЯМР. Изменения в

спектрах ^{31}P -ЯМР, обусловленные детергентными свойствами лизофосфолипидов, позволяют провести кинетические измерения разрушения липосом под действием фосфолипазы A_2 [53–56]. Метод ^{13}C -ЯМР также представляет большие возможности для наблюдения за перестройкой молекул липидов в ходе фосфолипазного гидролиза, но имеет ограниченное применение в данной области из-за очень низкой чувствительности [57]. В связи с этим предложили использовать субстраты, селективно меченные ^{13}C -атомами [58, 59].

В 1988 г. был предложен спин-меченый субстрат для измерения активности фосфолипазы A_2 методом электронного спинового резонанса [60]. Метод является быстрым и чувствительным (около 1 пмоль/мин), не требует, как и методы ЯМР, разделения субстрата и продуктов реакции, объем образца составляет 1 мкл. Недостатком, как и при использовании флуоресцентных субстратов, является отсутствие абсолютной специфичности к фосфолипазе A_2 в случае смеси ферментов [60].

4. ИНГИБИТОРЫ ФОСФОЛИПАЗЫ A_2

4.1. Неконкурентные ингибиторы

В соответствии со схемой 1, снижение каталитической активности фосфолипазы A_2 может происходить вследствие нарушения равновесия на одной или на нескольких стадиях ферментативной реакции, поэтому известные ингибиторы этого фермента можно условно разделить следующим образом.

А) *Связывание ингибитором фермента (E)* может сдвигать равновесие $E \rightleftharpoons E^*$ влево и понижать концентрацию каталитически активного E^* . Это происходит при добавлении к везикулам субстрата везикул негидролизуемого аналога субстрата, с которым фермент связывается, но не может быстро десорбироваться [23]. Необходимость наличия ионов кальция при связывании фосфолипазы A_2 с межфазной поверхностью дает основания относить к числу ингибиторов хелатирующие агенты, например EDTA.

Б) *Липофильные соединения* изменяют фазовые свойства субстратов и уменьшают плотность заряда на межфазной поверхности, сдвигая равновесие $E \rightleftharpoons E^*$ влево. Было показано, что такие изменения вызывают органические растворители, детергенты, спирты [61] (табл. 1), а также катионные амфифилы [62], фенотиазины и местные анестетики различной химической природы [62–64]. Другие ингибиторы – жирные кислоты, мепакрин, аристолоховая кислота – также влияют на стадию связывания–десорбции $E \rightleftharpoons E^*$, не затрагивая каталитического действия фермента на межфазной поверхности [65, 66].

В) *Некоторые типы неспецифического ингибирования.* При определенных условиях скорость гидролиза под действием фосфолипазы А₂ фосфолипидов, подвергшихся перекисному окислению, значительно увеличивается. Поэтому антиоксиданты считаются потенциально способными понижать активность фермента [23, 62, 63]. Белки типа липокортина и калпактина солюбилизируют фосфолипиды межфазной поверхности, тем самым снижая активность фосфолипазы А₂ [67, 68]. Водорастворимые анионы, такие как гепарин, ингибируют связывание фосфолипазы А₂ с межфазной поверхностью путем блокирования анионного участка связывания фермента [23].

Г) *Ковалентные модификации аминокислотных остатков фосфолипазы А₂.* 1-Бромоктан-2-он и *n*-бромфенацилбромид ковалентно связываются с His-48 в каталитическом центре фермента и полностью угнетают каталитическую активность; скорость такой модификации значительно снижается, когда фермент уже связан с межфазной поверхностью [69]. Диальдегиды, подобные госсиполу, модифицируют аминокислотные остатки лизина фосфолипазы А₂, ответственные за ее межфазное связывание; скорость модификации увеличивается в случае уже связанного с межфазной поверхностью фермента [23]. Подобным образом действуют нестероидный терпеноид маноалид, выделенный из морской губки [70] и его синтетический аналог маноалог [71].

Д) *Другие соединения.* Предположительно, многие другие соединения, в том числе некоторые лекарства, подавляют активность фосфолипазы А₂ *in vivo*, однако, механизм их ингибиторного действия еще не выяснен. Среди таких веществ – биофлавоноиды [72] и ретиноиды [72, 73], гидроксизатетраеновые кислоты [62, 63], фенофетол (агонист β-адренэргических рецепторов) [62, 63], габексатмезилат [74], нисерголин, папаверин, циннаризин и амперон [62, 63]. Некоторые неконкурентные ингибиторы представлены в табл. 1.

4.2. Конкурентные ингибиторы

Конкурентные ингибиторы фосфолипаз А₂ – это аналоги субстратов, продуктов реакции или комплекса переходного состояния. Они конкурируют с субстратом за связывание с активным центром молекулы Е*, эффективно понижая концентрацию комплекса ЕS* (схема 1). Этот механизм ингибирования был экспериментально подтвержден при изучении катализа фосфолипидов под действием фосфолипазы А₂ по типу “scooting” [23]. Математическое описание кинетики ингибирования для межфазного катализа приводится в обзорах [23, 75, 76].

Общепринятая стратегия создания ингибиторов состоит в замене чувствительной к фосфоли-

пазе А₂ сложноэфирной связи на негидролизуемую группу. При этом ингибитор должен оставаться близким структурным аналогом субстрата и не вызывать изменений в липидных мембранах. Представленные в обзоре экспериментальные данные зачастую не являются абсолютными, а зависят от выбранной кинетической модели и метода анализа. В настоящий момент не представляется возможным сопоставить имеющиеся данные о конкурентных ингибиторах, поскольку еще не выработано единой теории и количественного описания липолиза на границе раздела фаз липид/вода.

4.2.1. Аминоацильные фосфолипиды. Среди фосфатидилхолинов с модификацией *sn*-2-сложноэфирной связи был открыт класс мощных конкурентных ингибиторов фосфолипазы А₂ – *sn*-2-амидных аналогов [77, 78]. Замена *sn*-2-сложноэфирной связи на простую эфирную связь или на углеводородный остаток также приводила к ингибированию фосфолипазы А₂ по конкурентному типу, но в меньшей степени (табл. 2).

Влияние аминоацильных аналогов фосфолипидов на ферментативную активность фосфолипазы А₂ исследовалось, в основном, в модельных экспериментах со смешанными мицеллами при соблюдении следующих условий:

- 1) общая концентрация липидов (ингибитора и субстрата) [I] + [S] должна быть постоянной для расчета мольной доли ингибитора, $\alpha = [I]/([I] + [S])$;
- 2) молекулы субстрата и ингибитора должны занимать одинаковую площадь на межфазной поверхности;
- 3) межфазная поверхность мицелл должна быть достаточно большой, чтобы фермент находился только в связанной форме.

Для оценки воздействия ингибитора на активность фосфолипазы А₂ авторами работ [77, 78] была использована условная величина ингибиторной силы (Z), которая является мерой соотношения констант межфазной диссоциации для субстрата и ингибитора и определяется выражением:

$$R_v = 1 + \alpha Z,$$

где R_v – отношение скорости реакции при $K_i \neq K_m$ к скорости реакции при $K_i = K_m$; α – мольная доля ингибитора в мицелле [78]. Результаты исследований [77, 78] представлены в табл. 3.

Изучали также ингибиторное действие (*R*)-1-алкил-2-ациламино-1,2-дидезоксиглицеро-3-фосфохолиновых аналогов на панкреатические фосфолипазы млекопитающих. Среди ингибиторов с насыщенными жирнокислотными цепями наибольшую активность имели аналоги с C₁₀-ацильными цепями. Поведение ненасыщенных аналогов было более сложным как в цвиттерионных, так и в анионных ингибиторах, увеличение числа *цис*-двойных связей при определенном

Таблица 2. Взаимодействие панкреатической фосфолипазы A_2 свиньи с аминокислотными ингибиторами [77]*

№	Ингибитор			Субстрат		K_s , мМ	K_i , мМ	V_{\max}^i , мкмоль/(мг мин)
	R	R'	R''	R	R'			
(1)	C_6H_{13}	$NHCOC_6H_{13}$	$OPCho$	C_6H_{13}	C_6H_{13}	3.8	0.8	96
(2)	C_7H_{15}	$NHCOC_7H_{15}$	$OPCho$	C_6H_{13}	C_6H_{13}	4.2	0.54	45
(3)	C_6H_{13}	C_8H_{17}	$OPCho$	C_7H_{15}	C_7H_{15}	3.3	5.2	1040
(4)	C_7H_{15}	C_6H_{13}	$OPCho$	C_6H_{13}	C_6H_{13}	4.0	3.3	97
(5)	C_5H_{11}	C_5H_{11}	CH_2OPCho	C_6H_{13}	C_6H_{13}	8.7	7.2	–

* Все ингибиторы – рацематы. Субстрат и ингибитор (5 мМ) в мицеллярной форме с Тритоном X-100 (35 мМ), pH 8.0 (буфер 5.0 мМ Трис-HCl, 10 мМ $CaCl_2$), температура 30°C.

Таблица 3. Взаимодействие панкреатической фосфолипазы A_2 свиньи с длинноцепочечными аминокислотными аналогами субстрата [78]

№	Ингибитор			Субстрат			V_{\max}^S , мкмоль/ (мг мин)	V_{\max}^i , мкмоль/ (мг мин)	Z
	R	R'	R''	R	R'	R''			
(6)	$OCOC_{15}H_{31}$	$NHCOC_{13}H_{27}$	$OPCho$	$OCOC_{15}H_{31}$	$OCOC_{13}H_{27}$	$OPCho$	108	0	22
(7)	$NHCOC_{13}H_{27}$	$OCOC_{15}H_{31}$	$OPCho$	$OCOC_{13}H_{27}$	$OCOC_{15}H_{31}$	$OPCho$	81	20	0.1
(8)	$NHCOC_{13}H_{27}$	$OPCho$	$OCOC_{15}H_{31}$	$OCOC_{13}H_{27}$	$OPCho$	$OCOC_{15}H_{31}$	4.8	0	20
(9)	$OCOC_{15}H_{31}$	$OPCho$	$NHCOC_{13}H_{27}$	$OCOC_{15}H_{31}$	$OPCho$	$OCOC_{13}H_{27}$	2.7	<1	0.1
(10)	$NHCOC_{13}H_{27}$	$OPCho$	$OCOC_{15}H_{31}$	$OCOC_{13}H_{27}$	$OCOC_{15}H_{31}$	$OPCho$	81	0	8
(11)	$NHCOC_{13}H_{27}$	$OPCho$	$OCOC_{15}H_{31}$	$OCOC_{15}H_{31}$	$OCOC_{13}H_{27}$	»	108	0	10
(12)	$OCOC_{15}H_{31}$	$OPCho$	$NHCOC_{13}H_{27}$	$OCOC_{13}H_{27}$	$OCOC_{15}H_{31}$	»	81	<1	0.3
(13)	$OCOC_{15}H_{31}$	$OPCho$	$NHCOC_{13}H_{27}$	$OCOC_{15}H_{31}$	$OCOC_{13}H_{27}$	»	108	<1	0.3
(14)	$OCOC_{15}H_{31}$	$OC_{14}H_{29}$	$OPCho$	$OCOC_{15}H_{31}$	$OCOC_{13}H_{27}$	»	108	0	0.1
(15)	$OC_{14}H_{29}$	$OCOC_{15}H_{31}$	$OPCho$	$OCOC_{13}H_{27}$	$OCOC_{15}H_{31}$	»	81	27	0
(16)	$OCOC_{13}H_{27}$	$OPCho$	$OCOC_{15}H_{31}$	$OCOC_{15}H_{31}$	$OCOC_{13}H_{27}$	»	108	4.8	0.1
(17)	$OCOC_{15}H_{31}$	$OPCho$	$OCOC_{13}H_{27}$	$OCOC_{13}H_{27}$	$OCOC_{15}H_{31}$	»	81	2.7	0.1
(18)	$OCOC_{11}H_{23}$	$NHCOC_{11}H_{23}$	$OPCho$	$OCOC_{11}H_{23}$	$OCOC_{11}H_{23}$	»			40
(19)	$OPCho$	$NHCOC_{11}H_{23}$	$OCOC_{11}H_{23}$	$OCOC_{11}H_{23}$	$OCOC_{11}H_{23}$	»			0
(20)	$OCOC_{11}H_{23}$	$NHCOC_{11}H_{23}$	$OPGI$	$OCOC_{11}H_{23}$	$OCOC_{11}H_{23}$	»			1100
(21)	$OPGI$	$NHCOC_{11}H_{23}$	$OCOC_{11}H_{23}$	$OCOC_{11}H_{23}$	$OCOC_{11}H_{23}$	»			22
(22)	$OCOC_{11}H_{23}$	$NHCOC_{11}H_{23}$	$OPCho$	$OCOC_{11}H_{23}$	$OCOC_{11}H_{23}$	$OPGI$			17
(23)	$OCOC_{11}H_{23}$	$NHCOC_{11}H_{23}$	$OPGI$	$OCOC_{11}H_{23}$	$OCOC_{11}H_{23}$	»			400
(24)	$OPGI$	$NHCOC_{11}H_{23}$	$OCOC_{11}H_{23}$	$OCOC_{11}H_{23}$	$OCOC_{11}H_{23}$	»			12
(25)	ОН	$NHCOC_{11}H_{23}$	$OPGI$	$OCOC_{11}H_{23}$	$OCOC_{11}H_{23}$	$OPCho$			0.7
(26)	$OPGI$	$NHCOC_{11}H_{23}$	ОН	$OCOC_{11}H_{23}$	$OCOC_{11}H_{23}$	»			0.3
(27)	$OCOC_3H_7$	$NHCOC_{11}H_{23}$	$OPCho$	$OCOC_{11}H_{23}$	$OCOC_{11}H_{23}$	»			6.6

Примечания. V_{\max}^S и V_{\max}^i – скорости гидролиза для субстрата (3 мМ) и в присутствии ингибитора (3 мМ); детергент – дексихолат натрия (3 мМ), pH 8.0 (буфер 5.0 мМ Трис-HCl, 10 мМ $CaCl_2$), температура 25°C.

Ингибиторы (11), (12), (15), (16), (25) – рацематы.

расположении в ацильной цепи приводило к возрастанию параметра Z [80].

В ходе исследований с тиаамидными аналогами субстратов выяснилось, что тиаамидный аналог фосфатидилэтаноламина (28) с $IC_{50} = 4.5 \times 10^{-7}$ М является самым сильным из известных ингибиторов фосфолипазы A₂ (табл. 4) [81].

Исследования, проведенные с аминокислотными ингибиторами, выявили некоторые аспекты взаимодействия фермент/липид:

1. Введение амидного остатка в *sn*-2-положение фосфолипида значительно увеличивает его связывание с каталитическим центром фосфолипазы A₂: более нуклеофильный атом кислорода амидной группы способен сильнее взаимодействовать с электрофилом этого центра (предположительно, Ca²⁺). Амидная группа предоставляет лучшие возможности и для водородного связывания.

2. α-Метиленовая группа ацильного остатка в *sn*-2-положении фосфолипида отвечает за связывание фосфолипида с каталитическим центром фермента.

3. Увеличение гидрофобности функциональной группы в *sn*-1-положении фосфолипида повышает сродство между ферментом и субстратом.

4. Фосфатидилэтаноламины оказались более сильными ингибиторами, чем фосфатидилхолины.

Подход к синтезу оптически активных 1-ацил-2-амино-2-дезоксиглицерофосфохолинов основывается на сохранении хиральности исходного соединения (*L*-серина) на протяжении всего синтеза. Выбранная последовательность введения заместителей предполагает использование минимального числа защитных групп [82]. Также разработан стереоспецифический метод синтеза 1-алкил-2-амино-2-дезоксиглицерофосфохолинов исходя из *L*-серина. Введение алифатической алкильной группы осуществляют взаимодействием метансульфоната жирной кислоты с оксазолинзащищенным дезоксиглицеридом [83]. Рацемические длинноцепочечные ациламиноаналоги фосфолипидов предложено получать исходя из 2-аминопропанола [84]. Описан синтез оптически активного тиаамидного аналога фосфатидилхолина [81].

4.2.2. Фторкетонные аналоги. Ранее установлено, что аналоги субстратов, содержащие поляризованные кетонные группы, включая фторкетонные и 1,2-дикетонные, ингибируют гидролитические ферменты [85]. Авторы работ [86–88] предложили ряд фторкетонных аналогов фосфолипидов в качестве конкурентных ингибиторов фосфолипазы A₂ из яда змеи *Naja naja naja*. Наилучшим ингибитором оказался замещенный фосфоэтаноламин с единственным ацильным остатком (43), несмотря на то, что фермент предпочитает субстраты с двумя ацильными остатками

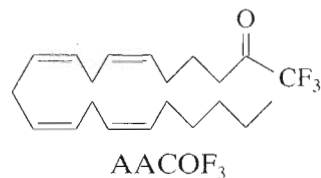
Таблица 4. Взаимодействие фосфолипазы A₂ из яда змеи *Naja naja naja* с тиаамидными ингибиторами [81]*

№	Структура ингибитора		IC ₅₀ , mM
	R	R'	
(28)	SC ₁₆ H ₃₃	PEtn	0.00045
(29)	SC ₁₆ H ₃₃	PCho	0.002
(30)	OC ₁₆ H ₃₃	PCho	0.038
(31)	OCOC ₁₆ H ₃₃	PCho	0.156

* Субстрат – 1,2-бис(деcanoилтио)-1,2-дидезокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (0.5 mM) в форме смешанных мицелл с Тритоном X-100 (4.0 mM), pH 8.5 (буфер 25 mM Трис-HCl, 0.1 mM KCl, 10 mM CaCl₂), температура 30°C.

[1]. Так как дифторкетонная группа легко гидратируется в водном растворе, ингибиторы напоминают по структуре тетраэдрический интермедиат, который образуется во время липолиза (табл. 5) [86–88].

Среди фторкетонных аналогов были найдены селективные ингибиторы внутриклеточных цитозольных фосфолипаз A₂. Такими ингибиторами оказались электрофильные кетонные аналоги арахидоновой кислоты [89].



Самым мощным ингибитором оказался α-трифторметилкетон арахидоновой кислоты (AACOF₃). Методами ¹⁹F- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии анализировали строение комплекса этого вещества с фосфолипазой A₂ [90]. Результаты подтвердили гипотезу о том, что при связывании с активным центром фермента AACOF₃ образует полукеталь с остатком серина или треонина молекулы белка, благодаря способности α-фторкетонных легко гидратироваться в водных растворах. Было показано, что восстановление группы COCF₃ до вторичного спирта [AACH(OH)CF₃] или ее замещение на CHO, CONH₂, COCH₃ значительно понижает способность соединения к ингибированию цитозольных фосфолипаз A₂. Кроме того, наблюдалась корреляция между степенью гидратации фторкетонных аналогов и ингибированием этих ферментов. Методом ¹⁹F-ЯМР установили, что в растворе смешанных мицелл молекула AACOF₃ гидратируется более чем на 90%, тогда как более слабые ингибиторы AACOCF₂Cl и AACOCF₂CF₃ гидратируются только на 60%.

Таблица 5. Взаимодействие фосфолипазы A₂ из яда змеи *Naja naja naja* с фторкетонowymi ингибиторами [86]

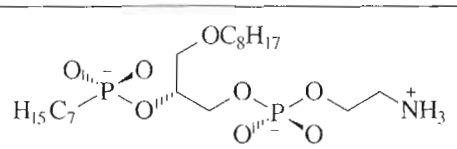
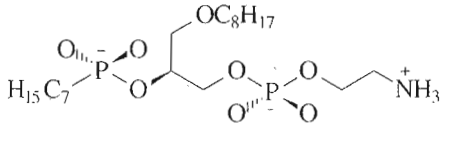
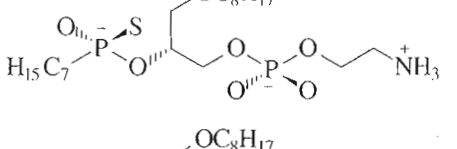
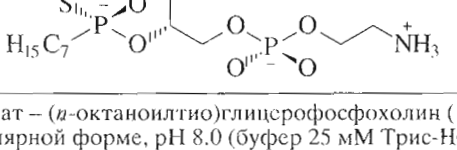
№	Структура ингибитора	IC ₅₀ , мМ
(32)	$C_{15}H_{31}-CO-CF_2-CH_2-CH_2-O-PCho$	0.7
(33)	$C_6H_{13}-CO-CF_2-CH_2-CH_2-O-PCho$	1.6
(34)	$C_7H_{15}O-CH_2-CH_2-CH_2-O-PCho$	≥4
(35)	$H_{31}C_{15}-CO-CF_2-CH_2-CH_2-O-PCho$	~4
(36)	$C_7H_{15}O-CH_2-CH_2-CH_2-O-PCho$	~4
(37)	$H_{13}C_6COF_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-PCho$	~4
(38)	$C_{15}H_{31}-\overset{OH}{\underset{ }{C}}H-CF_2-CH_2-CH_2-O-PCho$	≥4
(39)	$C_6H_{13}-CO-CH_2-CH_2-CH_2-O-PCho$	≥4
(40)	$C_6H_{13}OCO-CH_2-CH_2-CH_2-O-PCho$	1.7
(41)	$H_{11}C_5-CF_2-CO-CH_2-CH_2-CH_2-O-PCho$	4
(42)	$C_{16}H_{33}-OCO-CH_2-CH_2-CH_2-O-PCho$	4
(43)	$H_{31}C_{15}-CF_2CO-CH_2-CH_2-CH_2-O-PCho$	1.4
(44)	$C_{16}H_{33}-OCO-CH_2-CH_2-CH_2-O-PCho$	1.4
(45)	$H_{31}C_{15}-CF_2-\overset{OH}{\underset{ }{C}}H-CH_2-CH_2-CH_2-O-PCho$	1.4
(46)	$C_6H_{13}OCO-CH_2-CH_2-CH_2-O-PCho$	3.3
(47)	$H_{11}C_5-CO-CH_2-CH_2-CH_2-O-PCho$	3.3
(48)	$C_6H_{13}OCO-CH_2-CH_2-CH_2-O-PCho$	1.5
(49)	$C_{15}H_{31}-CO-CF_2-CH_2-CH_2-O-PEtn$	0.07
(50)	$C_7H_{15}O-CH_2-CH_2-CH_2-O-PEtn$	2
(51)	$H_{13}C_6COCF_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-PEtn$	2

Примечания. IC₅₀ – концентрация ингибитора, при которой происходит 50% снижение активности фермента.

Ингибиторы (34), (35), (38)–(42), (44) – рацематы.

Субстрат – дипальмитоилфосфатидилхолин (5 мМ) в форме смешанных мицелл с Тритоном X-100 (40 мМ), CaCl₂ (10 мМ), температура 35°C.

Таблица 6. Взаимодействие фосфолипазы A₂ из яда змеи *Naja naja naja* с фосфонатными и тиофосфонатными аналогами субстрата* [92]

№	Ингибитор	IC ₅₀ , мМ
	Структура	
(45)		0.5
(46)		2.5
(47)		0.5
(48)		8.0

* Субстрат – (*n*-октаноилтио)глицерофосфохолин (12 мМ) в мицеллярной форме, pH 8.0 (буфер 25 мМ Трис-HCl, 0.1 М KCl, 10 мМ CaCl₂), температура 25°C.

Избирательное ингибирование цитозольных фосфолипаз A₂ полиненасыщенными α-трифторметилкетонами подтвердило специфичность данных ферментов к арахидонатсодержащим фосфолипидам. Следует отметить, что все известные ингибиторы секретлируемых фосфолипаз A₂ оказались слабыми ингибиторами для цитозольных фосфолипаз A₂, что подтвердило гипотезу о различном строении каталитических центров этих типов ферментов.

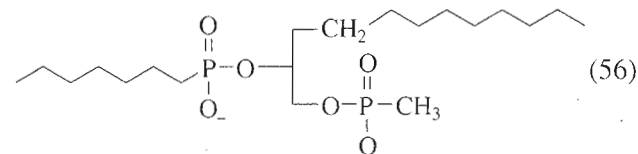
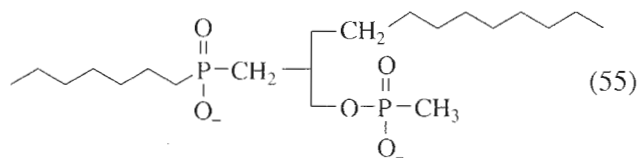
Получение фторкетонowych аналогов фосфолипидов описано в работе [86].

4.2.3. Фосфонатные и тиофосфонатные аналоги субстратов. Данный класс субстратных аналогов характеризуется замещением гидролизуемой *sn*-2-сложноэфирной группы на фосфонатную или тиофосфонатную. Такие соединения могут конкурентно ингибировать фосфолипазу A₂, так как фосфонатная группа по структуре подобна тетраэдрическому интермедиату, который образуется при гидролизе фосфолипидных субстратов [91, 92]. Включение этих соединений в везикулы из 1,2-димиристоилфосфатидилметанола подтвердило их ингибиторные свойства, при этом катализ протекал по пути “scooting” [92]. Исследования показали, что степень ингибирования находится в строгой зависимости от стереохимического располо-

жения заместителей в молекуле ингибитора (табл. 6) [92].

Для выяснения роли полярной группы липида при гидролизе были синтезированы фосфонатные аналоги, несущие более гидрофобную тиоэфирную группу в *sn*-1-положении глицерина и различные полярные головки, включая фосфохолиновую (49), фосфо(*N,N*-диметилэтаноламиновую) (50), фосфо(*N*-метилэтаноламиновую) (51) и фосфоэтаноламиновую (52) (табл. 7) [93]. Как ранее было установлено, ингибирование фермента фосфонатами зависит от pH среды. При увеличении pH до 8.5 ингибиторный эффект снижался (табл. 7). Однако, если фермент предварительно активировали сфингомиелином, ингибирование, напротив, увеличивалось. Эти данные подтвердили наличие у фосфолипаз A₂ двух функционально различных центров связывания – каталитического и активаторного. Установили, что полярная группа ингибитора оказывает незначительное влияние на гидролиз, но в отсутствие отрицательного заряда фосфонатной группы ингибиторный эффект резко снижается. Понижение ингибиторной способности метилированных фосфонатов (54) объясняют именно этим, а также стерическими затруднениями при связывании тетраэдрического комплекса с ферментом [93].

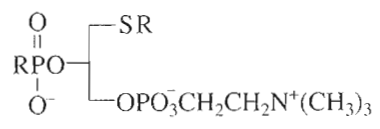
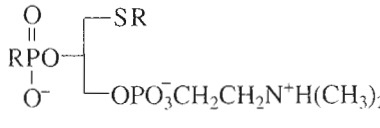
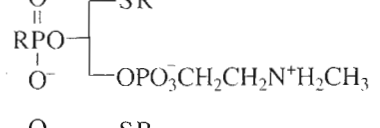
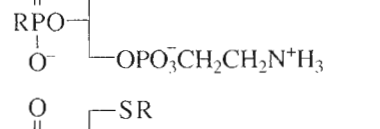
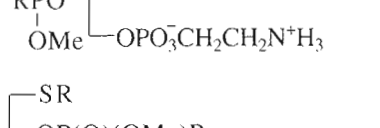
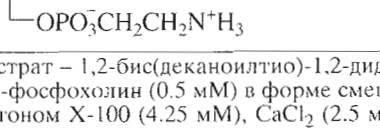
Синтезировали также *sn*-2-фосфинатный аналог субстрата (55) и изучали его в качестве возможного ингибитора панкреатической фосфолипазы A₂ свиньи и яда кобры [94]. Этот структурный аналог оказался слабым ингибитором (падение активности фосфолипаз A₂ в 50–130 раз меньше по сравнению с фосфонатным аналогом (56)). Полученные данные подтвердили гипотезу о том, что для связывания с активным центром фермента на мембранной поверхности в *sn*-2-положении молекулы ингибитора необходим кислородный мостик, способный к сольватации.



Синтез фосфонатных и тиофосфонатных липидных ингибиторов описан в работах [93, 95].

4.2.4. Хиральные по атому фосфора аналоги. Для изучения взаимодействия фосфолипазы A₂ из пчелиного яда с субстратами использовали R_p- и S_p-изомеры 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-тиофосфохолина (DPP_sC), синтезированные по мето-

Таблица 7. Взаимодействие фосфолипазы A₂ из яда кобры с 1-тиофосфонатными аналогами. Влияние pH среды и типа полярной головки ингибитора* [93]

№	Ингибиторы**	IC ₅₀ (мольные доли × 10 ⁻⁴)	
		Структура	pH 8.5
(49)		18	0.24
(50)		9.5	0.15
(51)		9.1	0.14
(52)		9.1	0.35
(53)		44	1.6
(54)		120	3.6

* Субстрат – 1,2-бис(деcanoилтио)-1,2-дидезокси-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (0.5 мМ) в форме смешанных мицелл с Тритоном X-100 (4.25 мМ), CaCl₂ (2.5 мМ), температура 30°C.

** Ингибиторы (49)–(52) – рацематы; R = C₁₆H₃₃.

Размерность IC₅₀ – мольная доля ингибитора в смеси с субстратом α = [I]/([I] + [S]).

дике [96]. При этом установили, что R_p-изомер (57) является подходящим субстратом фермента, а S_p-изомер (58) при наличии ионов Cd²⁺ служит конкурентным ингибитором гидролиза дипальмитоилфосфатидилхолина (табл. 8) [97]. Предполагают, что различия в поведении изомеров DPP_sC обусловлены именно стереоспецифичностью фермента. Поскольку холиновый остаток не является неотъемлемой структурной чертой фосфолипидов, то фосфатная группа служит основным участком в молекуле липида, способным к ионному взаимодействию с заряженными аминокислотными остатками или кофакторами фосфолипазы A₂. Такое взаимодействие должно быть специфичным к одному или двум диастереомерным атомам кислорода фосфата и отвечает, по-види-

Таблица 8. Взаимодействие фосфолипазы A_2 из яда пчелы с хиральными по атому фосфора субстратными аналогами* [97]

№	Структура липида	Ионы металла	K_m , мМ	$V_{\text{макс}}$, мкмоль/(мг мин)
(57)	$\begin{array}{c} \text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{OCO} \\ \text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{OCO} \end{array} \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \begin{array}{c} \text{S}_{\text{ин}} \\ \text{P} \\ \text{O} \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \text{O} \end{array} \begin{array}{c} \diagdown \\ \diagup \end{array} \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$ $((R_P)\text{-DPP}_S\text{C})$	Ca^{2+}	0.85	76
(58)	$\begin{array}{c} \text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{OCO} \\ \text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{OCO} \end{array} \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \begin{array}{c} \text{O}_{\text{ин}} \\ \text{P} \\ \text{O} \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{S} \\ \text{O} \end{array} \begin{array}{c} \diagdown \\ \diagup \end{array} \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$ $((S_P)\text{-DPP}_S\text{C})$	Ca^{2+}	0.3	0.044
(59)	$((R_P + S_P)\text{-DPP}_S\text{C})$	Ca^{2+}	2.1	54
(57)	$((R_P)\text{-DPP}_S\text{C})$	Cd^{2+}	0.24	0.069
(58)	$((S_P)\text{-DPP}_S\text{C})$	Cd^{2+}	—	0.0044

* Субстраты (57)–(59) (10 мкМ) использовали в форме мицелл с Тритоном X-100 (1.5 мМ), pH 7.23 (буфер 5 мМ CaCl_2 , 0.1 мМ EDTA), температура 23°C.

тому, за стереоспецифичность фосфолипазы A_2 относительно R_P - и S_P -изомеров DPP_SC [97].

Замена одного атома кислорода, связанного с атомом фосфора, на атом серы вызывает незначительные изменения в структурных свойствах, что подтверждается данными ^{13}C - и ^1H -ЯМР-спектроскопии. В спектрах ^{31}P -ЯМР тиофосфату соответствует отдельный сигнал, что дает возможность следить за поведением тиофосфолипидов в сложных системах. В природных фосфолипидах атом фосфора – прохиральный центр, а два атома кислорода диастереотопны. При взаимодействии с хиральным компонентом, таким как фермент, прохиральный P-центр, вероятно, становится хиральным благодаря стереоспецифическому взаимодействию фермента с одним из двух диастереомерных атомов кислорода. Поэтому эти аналоги использовали для изучения механизма действия фермента [97].

4.2.5. Фосфатные аналоги. Для изучения природы ингибирования фосфолипаз A_2 из различных источников и влияния заместителей на ингибиторную способность было синтезировано более 100 *sn*-2-фосфатных аналогов фосфатидилхолинов; все соединения были получены в виде рацематов [98]. Соединения данного класса ингибировали только фермент, уже связанный с межфазной поверхностью и не оказывали влияния на десорбцию фермента. Фосфатные ингибиторы связываются с активным центром фермента через ион кальция координационной связью $\text{E}-\text{Ca}\cdots\text{O}=\text{P}$, конкурируя с субстратами. Это взаимодействие модулируется заместителями молекулы ингибитора. Замещение в этом комплексе атома O на S, NH_2 , группы $\text{O}=\text{P}$ на $\text{O}=\text{C}-\text{O}$, присутствие отрицательно

заряженной фосфатной группы значительно понижало сродство к ферменту. Ингибиторная способность фосфоэфиров находилась в строгой зависимости от стереохимических и структурных особенностей: хиральности *sn*-2-положения, длины алкильной цепи в *sn*-1-положении и присутствия гидрофобного заместителя в *sn*-3-положении глицерина. Сульфонатные, амидные, оксимсодержащие, дианионные фосфомоноэфирные аналоги не проявляли ингибиторных свойств (табл. 9) [98].

4.2.6. Алкильные фосфатидилхолины. Для фармакологического использования, по-видимому, наиболее перспективными являются вещества, способные ингибировать фосфолипазы A_2 без нарушения структурной организации мембраны. Особый интерес в этом плане представляют липиды с простой эфирной связью. В молекулах липидов данного класса гидрофобные заместители присоединены к гидрофильному остатку за счет негидролизуемой фосфолипазами A_2 простой эфирной связи. Вместе с тем, по своему поведению в составе мембран липиды с простой эфирной связью практически не отличаются от своих диацильных аналогов. В проводившихся ранее работах было показано, что короткоцепочечные фосфатидилхолины ацилалкильного [10] и диалкильного [99] типов являлись конкурентными ингибиторами фосфолипаз A_2 . Однако исследования проводили на мицеллярных системах, что неадекватно отражало картину гидролиза фосфолипидов в составе бислоя. Кроме того, детергентные свойства короткоцепочечных фосфатидилхолинов исключают возможность их использования для защиты мембран от воздействия фосфолипаз A_2 . В связи с этим изучали влияние длинноцепочечных фосфатидилхолинов с про-

Таблица 9. Взаимодействие с фосфатными ингибиторами фосфолипаз A₂: панкреатической свинной (PP), из ядов змей *Agkistrodon haly* (АН) и *Crotalus atrox* (СА) [98]

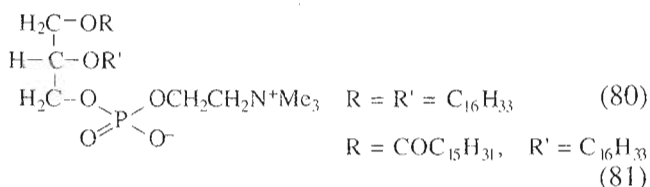
№	Ингибитор			IC ₅₀ , мольные доли		
	Структура ингибитора; заместители в остатке Gro			PP	АН	СА
	sn-1	sn-2	sn-3			
(60)	OC ₁₆ H ₃₃	OPMe	OCH ₂ CF ₃ rac	0.0060	0.0033	0.036
(61)	OC ₁₆ H ₃₃	OPMe	OCH ₂ CF ₃ (S)-(+)	0.0028	0.017	0.016
(62)	OC ₁₆ H ₃₃	OPMe	OCH ₂ CF ₃ (R)-(-)	>0.1	>0.1	>0.1
(63)	OCOC ₁₅ H ₃₁	OPMe	H	0.28	0.16	>0.3
(64)	OCOC ₁₅ H ₃₁	OPMe	OCH ₂ CF ₃	Слабый субстрат		
(65)	OC ₁₆ H ₃₃	OPMe	OMe	0.013	0.027	0.021
(66)	OC ₁₆ H ₃₃	OPMe	OH	0.042	0.038	0.02
(67)	OC ₁₆ H ₃₃	OPMe	Br	0.016	0.014	0.014
(68)	OC ₁₆ H ₃₃	OPMe	CN	>0.3	>0.3	>0.3
(69)	OC ₁₆ H ₃₃	OPMe	OPMe	0.18	0.046	>0.2
(70)	OC ₁₆ H ₃₃	OPMe	CH ₂ COOH	0.02	0.1	0.015
(71)	OC ₁₆ H ₃₃	OPMe	CH ₂ CH=CH ₂	0.04	0.05	0.02
(72)	OC ₁₆ H ₃₃	OPMe	OCH ₂ CH=CH ₂	0.0023	0.0028	0.026
(73)	OC ₁₆ H ₃₃	OPMe	OCH=CHCH ₃	0.14	0.21	0.27
(74)	OC ₁₆ H ₃₃	OPMe	O-Tos	0.0048	0.014	0.004
(75)	OC ₁₆ H ₃₃	OPMe	$\begin{matrix} \text{O} \\ \\ \text{O} \end{matrix}$ -OCH ₂ CH-CH ₂	0.011	0.08	0.35
(76)	OC ₁₆ H ₃₃	OPMe	OCH ₂ CHBrCH ₂ Br	0.0019	0.0040	0.011
(77)	OC ₁₆ H ₃₃	OPMe	OCH ₂ CCl ₃	0.00042	0.0023	0.02
(78)	OC ₁₆ H ₃₃	OPMe	OCH ₂ CH=CH(Ph)	0.012	0.034	0.06
(79)	OC ₁₆ H ₃₃	OPMe	OC(Ph) ₃	0.022	0.03	>0.5

Примечания. Ингибиторы (60)–(79) – рацематы.

Размерность IC₅₀ – мольная доля ингибитора в смеси с субстратом α = [I]/([I] + [S]).

Субстрат – димиристоилфосфометанол (0.28 мМ) в форме везикул, рН 8.0 (буфер 0.5 мМ CaCl₂, 1 мМ NaCl), температура 23°C.

стой эфирной связью на разрушение мембран под действием фосфолипазы A₂ методом спектроскопии ³¹P-ЯМР и оценивали возможность применения липидов (80), (81) при местных воспалительных реакциях [54].



Для исследуемых ингибиторов были получены практически одинаковые результаты: введение соединений (80) и (81) в состав липидного бислоя из яичного фосфатидилхолина в мольном соотношении 1 : 1 приводило к настолько эффективной стабилизации мембран, что не наблюдалось никаких структурных перестроек под действием этого фермента [54].

Среди фосфолипидов данного класса были найдены ингибиторы цитозольных фосфолипаз

A₂, обладающие противовоспалительными и антиаллергическими свойствами [100–102].

5. БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ФОСФОЛИПАЗ A₂

К настоящему времени достаточно полно охарактеризованы и изучены секретируемые фосфолипазы A₂ ядов и панкреатических желез млекопитающих. Напротив, относительно низкие концентрации *in vivo* внутриклеточных и непанкреатических внешеклеточных фосфолипаз A₂ серьезно осложняют исследования этого класса ферментов. Полученные к настоящему времени данные о функциональных и физико-химических аспектах действия внутриклеточных фосфолипаз A₂ представлены в работах [2, 14–17, 105, 106].

Установлено, что мембраносвязанные фосфолипазы A₂ играют важную роль в регуляторных процессах клеточного метаболизма [107]. Известно несколько путей регуляции этих ферментов, однако общий механизм очень сложен и до конца не изучен [16, 105, 108, 109]. Фосфолипаза A₂ участвует в передаче через мембраны химических

сигналов в ответ на внешнее воздействие [16, 62, 107, 110–113]. Фермент эффективно гидролизует фосфолипиды, имеющие в своем составе пероксиды жирных кислот, восстанавливая структурно-функциональные свойства клеточных мембран [114–118]. По-видимому, изменение молекулярной конформации окисленных липидов облегчает доступ фермента к *sn*-2-сложноэфирной связи.

На сегодняшний день установлено, что фосфолипазы A_2 играют значительную роль в развитии воспалительного процесса [5, 119–122]. Вклад фермента заключается в запуске синтеза липидных регуляторов этой реакции – одной из групп так называемых химических медиаторов воспаления. Они образуются, активируются или мобилизуются в воспалительном очаге и их соотношением определяется характер течения патологического процесса. Медиаторы воспаления липидной природы представлены жирными кислотами и их производными (простагландинами, лейкотриенами, тромбоксанами), а также фосфолипидным фактором активации тромбоцитов (ФАТ) [3, 107]. Полагают, что в воспалительном процессе участвуют внутриклеточные цитозольные фосфолипазы A_2 (молекулярная масса 60 – 110 кДа), высвобождающие полиеновые кислоты из *sn*-2-положения глицеринового остатка мембранных фосфолипидов. Полиеновые жирные кислоты, включая и арахидоновую, обладают собственной биологической активностью, в т.ч. усиливают сосудистую проницаемость, вызывают агрегацию тромбоцитов, оказывают вазоактивное действие [123, 124].

Другие продукты фосфолипазной реакции гидролиза – лизофосфолипиды, обладающие ярко выраженной цитотоксичностью и детергентными свойствами [63, 126, 127]. Эти соединения обнаруживают при таких заболеваниях, как холецистит, инфаркт миокарда, катаракта, псориаз и др. [62, 63]. Если жирная кислота высвобождается из фосфатидилхолина 1-*O*-алкильного типа, образующийся лизофосфолипид служит предшественником ФАТ – медиатора воспаления, аллергической реакции, септического шока и астматического состояния [126–128]. Это соединение в настоящее время интенсивно изучается, агонистам и антагонистам ФАТ посвящено большое число публикаций, например [4, 107, 126–128, 130–135].

Важное значение, которое имеет мембраносвязанная фосфолипаза A_2 в клеточной регуляции, а также ее повышенный уровень при ряде патологических процессов, приводят к необходимости регулирования активности этого фермента. Поэтому поиск новых классов липидных ингибиторов и разработка удобных методов их синтеза представляют в настоящее время практический интерес.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брокерхоф Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты. М.: Мир, 1978.

2. Gijion M.A., Leslie C.C. // *Semin. Cell Dev. Biol.* 1997. V. 8. P. 297–303.
3. Murakami M., Nakatani Y., Atsumi G., Inoue K., Kudo I. // *Crit. Rev. Immunol.* 1997. V. 17. P. 225–283.
4. Snyder F. *Platelet-activating Factor and Related Lipid Mediators*. N.Y.: Plenum Press, 1987. P. 89–113.
5. Vadas P., Browning J., Edelson J., Pruzanski W. // *J. Lipid Mediators*. 1993. V. 8. P. 1–30.
6. Gelb M.H., Jain M.K., Hanel A.M., Berg O.G. // *Annu. Rev. Biochem.* 1995. V. 64. P. 653–688.
7. Jain M.K., Gelb M.H., Rogers J., Berg O.G. // *Methods Enzymol.* 1995. V. 249. P. 567–614.
8. Burack W.R., Biltonen R.L. // *Chem. Phys. Lipids*. 1994. V. 73. P. 209–222.
9. Van Deenen L.L.M., de Haas G.H. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1963. V. 70. P. 538–553.
10. Bonsel P.P.M., de Haas G.H., Pieterse W.A., van Deenen L.L.M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1972. V. 270. P. 364–382.
11. Salach J.J., Seng R., Tisdale H.D., Singer T.P. // *J. Biol. Chem.* 1971. V. 246. P. 340–347.
12. Aarsman A.J., van Deenen L.L.M., van den Bosch H. // *Bioorg. Chem.* 1976. V. 5. P. 241–253.
13. Kuipers O.P., Dekker N., Verheij H.M., de Haas G.H. // *Biochemistry*. 1990. V. 29. P. 6094–6102.
14. Kramer R.M., Hession K., Jonansen B., Hayes G., McGray R., Chow E.P., Tizard R., Peninsky R.B. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 5768–5775.
15. Van den Bosch H., Aarsman A.J., van Schael P.H.N., Schalkwijk C.G., Neijts F.W., Sturk A. // *Biochem. Soc. Trans.* 1990. V. 18. P. 781–785.
16. Van den Bosch H. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1980. V. 604. P. 191–246.
17. Berezat G., Etienne J., Kokkinidis M., Olivier J.L., Perinas P. // *J. Lipid Mediators*. 1990. V. 2. P. 159–172.
18. Wheeler T. N., Blanchard S.G., Carson M., Han R., Madison V.S. // *J. Med. Chem.* 1994. V. 37. P. 4118–4129.
19. Hope W.C., Chen T., Morgan D.W. // *Agents Actions*. 1993. V. 39. P. 39–42.
20. Bayburt T., Yu B.Z., Lin H.K., Browning J., Jain M.K., Gelb M.H. // *Biochemistry*. 1993. V. 32. P. 573–582.
21. Araujo P.S., Rosseneu M.Y., Kremer J.M.H., Zouelen E.J.J., de Haas G.H. // *Biochemistry*. 1979. V. 18. P. 580–586.
22. Berg O.G. // *Biophys. J.* 1985. V. 47. P. 1–14.
23. Jain M.K., Berg O.G. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1989. V. 1002. P. 127–156.
24. Upreti G.C., Jain M.K. // *J. Membr. Biol.* 1980. V. 55. P. 113–121.
25. Verger R., Mieras M.C.E., de Haas G.H. // *J. Biol. Chem.* 1973. V. 248. P. 4023–4024.
26. Tinker D.O., Purdon A.D., Wei J., Mason E. // *Can. J. Biochem.* 1978. V. 56. P. 4023–4024.
27. Jain M.K., Yu B.Z., Gelb M.H., Berg O.G. // *Mediators Inflammation*. 1992. V. 1. P. 85–100.
28. Van den Bosch H., Aarsman A.J. // *Agents Actions*. 1979. V. 9. P. 382–389.
29. Jain M.K., Egmond M.R., Verheij H.M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1982. V. 688. P. 341–348.
30. Apitz-Castro R.J., Jain M.K., de Haas G.H. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1982. V. 688. P. 349–356.

31. Adachi I., Toyoshima S., Osawa T. // Arch. Biochem. Biophys. 1983. V. 226. P. 118–124.
32. Wolf R.A., Gross R.W. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 7295–7303.
33. Katsumata M., Gupta C., Goldman A. S. // Anal. Biochem. 1986. V. 154. P. 576–681.
34. Petet J.V., Boucrot P., Lang F., Welin L. // Arch. Int. Physiol., Biochim., Biophys. 1994. V. 102. P. 271–275.
35. Burch R.M. // Methods Mol. Biol. 1995. V. 41. P. 279–284.
36. Moores G.R., Lawrence A.J. // FEBS Lett. 1972. V. 28. P. 201–204.
37. Gale P.H., Egan R.W. // Anal. Biochem. 1979. V. 104. P. 489–493.
38. Kurooka S., Okamoto S., Hashimoto M. // J. Biochem. 1977. V. 81. P. 361–369.
39. Volwerk J.J., Dedieu A.G.R., Verheij H.M. // Rec. Trav. Chim. 1979. V. 98. P. 214–220.
40. Hendrickson H.S., Hendrickson E.K., Dybvig R.H. // J. Lipid Res. 1983. V. 24. P. 1532–1537.
41. Bhatia S.K., Hajdu J. // Tetrahedron Lett. 1987. V. 28. P. 3767–3770.
42. Reynolds L.J., Hughes L.L., Yu L., Dennis E.A. // Anal. Biochem. 1994. V. 217. P. 25–32.
43. Wolf C., Sagaert L., Berezziat G. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1981. V. 99. P. 275–283.
44. Thuren C., Virtanen J.A., Vainio P., Kinnunen P.K.J. // Chem. Phys. Lipids. 1983. V. 33. P. 283–292.
45. Hendrickson H.S., Rauk P.N. // Anal. Biochem. 1981. V. 116. P. 553–558.
46. Thuren T., Virtanen J.A. // Anal. Biochem. 1988. V. 170. P. 248–255.
47. Hirashima Y., John S.M., Yates A.J., Horrocks L.A. // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1047. P. 35–40.
48. Hendrickson H.S., Hendrickson E.K., Rustad T.J. // J. Lipid Res. 1987. V. 28. P. 864–872.
49. Hendrickson H.S., Kotz K.J., Hendrickson E.K. // Anal. Biochem. 1990. V. 185. P. 80–83.
50. Schindler P.W., Walter R., Hendrickson H.S. // Anal. Biochem. 1988. V. 174. P. 477–484.
51. Radvanyi F., Forden J., Russo-Marie F., Ban C. // Anal. Biochem. 1989. V. 177. P. 103–109.
52. Johnson J.D., Taskinen M.R., Matsuoka N., Jackson R.L. // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. P. 3461–3465.
53. Jain M.K., van Echteld C.J.A., Ramirez F., de Gier J., de Haas G.H., van Deenen L.L.M. // Nature. 1980. V. 284. P. 486–487.
54. Чупин В.В., Аникин М.В., Серебренникова Г.А., Марголин Я.М., Крейнс В.М., Устьянцева И.М., Булгаков В.Г., Шальнев А.Н. // Биол. мембраны. 1992. Т. 9. С. 349–358.
55. Henderson T.O., Kruski A.W., Davis L.G., Glone K.T., Scanu A.M. // Biochemistry. 1975. V. 14. P. 1915–1920.
56. Brasure E.B., Henderson T.O., Glonek T., Pathnaic N.M., Scanu A.M. // Biochemistry. 1978. V. 17. P. 3934–3938.
57. Debose C.D., Roberts M.F. // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. P. 6327–6334.
58. Schmidt C.F., Barenholz Y., Huang C., Thompson T. // Biochemistry. 1977. V. 16. P. 3948–3953.
59. Bhamidipati S.P., Hamilton J.C. // Biochemistry. 1989. V. 28. P. 6667–6672.
60. Lai C.-S., Zhang J.Z., Jaj J. // Anal. Biochem. 1988. V. 172. P. 397–402.
61. Jain M.K., Jahagirdar D.V. // BBA. 1985. V. 814. P. 319–326.
62. Vadas P., Pruzanski W. // Lab. Invest. 1986. V. 55. P. 391–404.
63. Blackwell G.J., Flower R.J. // Br. Med. Bull. 1983. V. 39. P. 260–264.
64. Sephola A.J., Saris N.-E.L. // Biochem. Pharmacol. 1971. V. 20. P. 305–313.
65. Rosenthal M.D., Vishwanath B.S., Franson R.C. // Biochim. Biophys. Acta. 1989. V. 1001. P. 1–8.
66. Ballou L.R., Cheung W.Y. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 371–375.
67. Flowrence F., Davidson, Dennis E.A. // Biochem. Pharmacol. 1989. V. 38. P. 3645–3651.
68. Garcia M.T., Zipfel M., Buhl W.J. // Biochem. Soc. Trans. 1990. V. 18. P. 1231–1232.
69. Kyger E.M., Franson R.S. // Biochim. Biophys. Acta. 1984. V. 794. P. 96–103.
70. Jacobson P.B., Marshall L.A., Sung A., Jacobs R.S. // Biochem. Pharmacol. 1990. V. 39. P. 1557–1564.
71. Reynolds L.J., Mihelich E.D., Dennis E. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 16512–16517.
72. Fawzy A.A., Vishwanath B.S., Franson R.C. // Agents. Actions. 1988. V. 25. P. 134–137.
73. Marcelo C., Bartel R., Fortune J. // Clin. Res. 1986. V. 34. P. 766A.
74. Nishijima J.I., Okamoto M., Nakaguchi K., Ogawa M., Yamano T., Mori T. // Gen. Pharmacol. 1985. V. 16. P. 177–182.
75. Verheij H.M., Slotboom A.J., de Haas G.H. // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 1981. V. 91. P. 92–202.
76. Verger R., de Haas G.H. // Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 1976. V. 5. P. 77–119.
77. De Haas G.H., van Oort M.G., Dijkman R., Verger R. // Biochem. Soc. Trans. 1989. V. 17. P. 274–276.
78. De Haas G.H., Dijkman R., van Oort M.G., Verger R. // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1043. P. 75–82.
79. Thunnissen M.M.G.M., Eiso A.B., Dijkman R., de Haas G.H., Verheij H.M. // Nature. 1990. V. 347. P. 689–691.
80. Dijkman R., Cox R., van den Berg L., Verheij H. M., de Haas G.H. // Biochim. Biophys. Acta. 1994. V. 1212. P. 50–58.
81. Yu L., Deems R.A., Hajdu J., Dennis E.A. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 2657–2664.
82. Chandrakumar N.S., Hajdu J. // Tetrahedron Lett. 1981. V. 22. P. 2949–2952.
83. Chandrakumar N.S., Hajdu J. // J. Org. Chem. 1983. V. 48. P. 1197–1202.
84. Dijkman R., Dekker N., de Haas G.H. // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1043. P. 67–74.
85. Gelb M.H., Svaren J.P., Abeles R.H. // Biochemistry. 1985. V. 24. P. 1813–1817.
86. Yuan W., Berman R.J., Gelb M.H. // J. Am. Chem. Soc. 1987. V. 109. P. 8071–8081.
87. Yuan W., Fearon K., Gelb M.H. // J. Org. Chem. 1989. V. 54. P. 906–910.
88. Gelb M.H. // J. Am. Chem. Soc. 1986. V. 108. P. 3146–3149.
89. Street I.P., Lin H.-K., Laliberti F., Ghomashchi F., Gelb M.H. // Biochemistry. 1993. V. 32. P. 5935–5940.

90. Trimble L.A., Street I.P., Perrier H., Tremblay N.M., Weech P.K., Bernstein M.A. // *Biochemistry*. 1993. V. 32. P. 12560–12565.
91. Yuan Wei, Quinn D.M., Sigler P.B., Gelb M.H. // *Biochemistry*. 1990. V. 29. P. 6082–6094.
92. Jain M.K., Yuan W., Gelb M.H. // *Biochemistry*. 1989. V. 28. P. 4135–4140.
93. Yu L., Dennis E.A. // *Biochemistry*. 1993. V. 32. P. 10185–10192.
94. Lin H.K., Gelb M.H. // *J. Am. Chem. Soc.* 1993. V. 115. P. 3932–3942.
95. Yuan W., Fearon K., Gelb M.H. // *J. Org. Chem.* 1989. V. 54. P. 906–910.
96. Bruzik K., Jiang R.-T., Tsai M.-D. // *Biochemistry*. 1983. V. 22. P. 2478–2486.
97. Tsun-Chung Tsoi, Hart J., Jiang R.T., Bruzik K., Tsai M.D. // *Biochemistry*. 1985. V. 24. P. 3180–3188.
98. Jain M.K., Tao W., Rogers J., Arenson C., Eibl H., Yu B.-Zh. // *Biochemistry*. 1991. V. 30. P. 10256–10268.
99. Burns R.A., Friedman J.M., Roberts M.F. // *Biochemistry*. 1981. V. 20. P. 5945–5950.
100. Yazama K., Masuzawa Y., Kano M. // *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*. JP 07, 126, 166 [95, 126, 166] (Cl. A 61 K 31/66).
101. Letourneux Y., Bourass J., Elkihel L., Boucrot P., Petit J.Y., Welin L. // *J. Enzyme Inhib.* 1995. V. 9. P. 135–145.
102. Petit J.Y., Boucrot P., Lang F., Welin L. // *Arch. Int. Physiol., Biochim. Biophys.* // 1994. V. 102. P. 271–275.
103. Dennis E.A. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 13057–13060.
104. Mukherjee A.B., Miele L., Pattabiraman N. // *Biochem. Pharmacol.* 1994. V. 48. P. 1–10.
105. Kramer R.M., Shorp J.D. // *FEBS Lett.* 1997. V. 410. P. 49–53.
106. Balsinde J., Dennis E.A. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 16069–16072.
107. Williams T.J.P. // *Br. Med. Bull.* 1983. V. 39. P. 238–242.
108. Soltzman L.A. // *J. Cell. Biochem.* 1992. Suppl. 16 B. P. 217.
109. Flower R. // *Biochem. Soc. Trans.* 1989. V. 17. P. 276–278.
110. Shimizu T., Wolfe L.S. // *J. Neurochem.* 1990. V. 55. P. 1–15.
111. Traill K.N., Wick G. // *Immunol. Today*. 1984. V. 5. P. 70–76.
112. Wood J.N. // *Biochem. Soc. Trans.* 1990. V. 18. P. 785–789.
113. Volterra A. // *Cell Biol. Int. Rep.* 1989. V. 12. P. 1189–1198.
114. Van Kuijk F.J.G.M., Seveniak A., Handleman G.J., Dratz E.A. // *Trends Biochem. Sci.* 1987. V. 12. P. 31–34.
115. Sevanian A., Wrathen M. L., McLeod L.L., Kim L. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1988. V. 961. P. 3162–3167.
116. Berg van den J.J.M., Op den Kamp J.A.F., Lubin B.H., Kuypers F.A. // *Biochemistry*. 1993. V. 32. P. 4962–4967.
117. Varshney R., Kale R.K. // *Radiat. Phys. Chem.* 1995. V. 45. P. 671–675.
118. Salgo M.G., Squadrito G.L., Pryor W.A. // *Chem. Res. Toxicol.* 1994. V. 7. P. 458–462.
119. Cunningham F. // *J. Lipid Mediators*. 1990. V. 2. P. 61–74.
120. Vadas P., Wasi S., Movat H.S., Hay J.B. // *Nature*. 1981. V. 293. P. 583–586.
121. Pruzanski W., Vadas P., Browning J. // *J. Lipid Mediators*. 1993. V. 8. P. 161–167.
122. Levistre R., Pernas P., Masliah J., Berezat G. // *Dev. Oncol.* 1993. V. 71. P. 187–190.
123. Irvine R.F. // *Biochem. J.* 1982. V. 204. P. 3–16.
124. Snyder F. // *Med. Res. Rev.* 1985. V. 5. P. 107–140.
125. Snyder F. // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1989. V. 190. P. 125–135.
126. Braquet P., Mencia-Huerta J.M., Chabrier P.E., Touquit L., Vargaftig B.B. // *ISI Atlas of Science: Pharmacology*. 1987. P. 187–197.
127. Cooper K., Parry M. // *Annu. Rep. Med. Chem.* 1989. V. 24. P. 81–90.
128. Pretoloni M., Ferrer-Lopez P., Vargaftig B.B. // *Biochem. Pharmacol.* 1989. V. 38. P. 1373–1384.
129. Benveniste J. P. // *Adv. Prostaglandin, Thromboxane, Leukotriene Res.* 1989. V. 19. P. 355–358.
130. Denizot Y., Dupuis F., Praloran V. // *Bull. Inst. Pasteur*. 1995. V. 93. P. 43–51.
131. Nathan N. // *J. Lipid Mediators Cell Signalling*. 1995. V. 11. P. 103–104.

Lipid Inhibitors of Phospholipase A₂

N. A. Bragina^{*,#}, V. V. Chupin^{*}, V. G. Bulgakov^{**}, and A. N. Shahev^{**}

^{*}Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, prosp. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

^{**}Central Institute of Traumatology and Orthopedics, Ministry of Health Protection, Moscow, Russia

Results of studies of lipid inhibitors of phospholipase A₂ are reviewed with a special emphasis on substrate specificity, special features of interfacial catalysis, and methods for the determination of the enzyme activity. The biological function of intracellular phospholipases is considered, and the possible use of inhibitors of a lipid nature for the modulation of the enzyme activity in pathological states of the human organism is discussed.

Key words: phospholipase A₂, inhibitors, phospholipids, arachidonic acid metabolites, platelet activation factor

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: 434-8544; fax: +7 (095) 430-7983.