

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԱՅՎԱԶՅԱՆ ՆԱԻՐԱ ՄԱՐՏԻՆՈՎՆԱ

MACROVIPERA LEBETINA OBTUSA և *MONTIVIPERA RADDEI* Իժեմի ԹՈՒՅՆԻ
ԹԱՂԱՆԹԱԹՐՈՂ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ԿԵՆՍԱՖԻԶԻԿԱԿԱՆ ԱՍՊԵԿՏՆԵՐԸ

Գ.00.02-Կենսաֆիզիկա մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների դոկտորի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

Ս Ե Ղ Մ Ա Գ Ի Ր

Երևան 2014

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

АЙВАЗЯН НАИРА МАРТЫНОВНА

БИОФИЗИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МЕМБРАНОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ ЯДОВ ГАДИОК
MACROVIPERA LEBETINA OBTUSA И *MONTIVIPERA RADDEI*

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук по специальности
03.00.02 – Биофизика

Ереван -2014

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝	ՌԴ ԳԱ թղթ. անդամ, կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Ա.Բ. Կրիվչենկո ֆիզմաթ.գիտ. դոկտոր, պրոֆ.Վ.Բ. Առաքելյան կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Մ.Բ. Աղաջանով
Առաջատար կազմակերպություն՝	Ռուսաստանի գիտությունների ակադեմիայի ակադ. Մ.Մ. Շեմյակինի և Յ.Ա. Օվչինիկովի անվ. Կենսաօրգանական քիմիայի ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2014թ. դեկտեմբերի 25-ին, ժամը 14⁰⁰-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսաֆիզիկայի 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2014թ. նոյեմբերի 21-ին:

051 մասնագիտական խորհրդի գիտ. քարտուղար,
կենս. գիտ. թեկնածու, դոցենտ՝

Մ.Ա. Փարսադանյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Официальные оппоненты:

член-корр. РАН, доктор биол.наук,
профессор А.И. Кривченко
доктор физ.-мат. наук, профессор В.Б. Аракелян
доктор биол. наук, профессор М.И. Агаджанов

Ведущая организация:

Институт биоорганической химии имени
акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

Защита диссертации состоится 25-ого декабря 2014г. в 14⁰⁰ часов на заседании Специализированного совета 051 по биофизике ВАК РА при Ереванском государственном университете (РА, 0025, г. Ереван, ул. А.Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат разослан 21-ого ноября 2014г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051,
Кандидат биол. наук, доцент

М.А. Парсаданян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Модификация липосом белками различных ядов с их подчас уникальными свойствами и ярко-выраженной структурно-функциональной детерминантностью – информативный метод для понимания топологии белок-мембранных комплексов и того, как эти комплексы могут изменять пластическое состояние липидной мембраны (а именно, текучесть, толщину, проницаемость, ионную селективность, и т.д.). Существует специфическая асимметрия липидов, которая играет важную роль в активации мембранных белков и реализации многочисленных функций мембран. Разнообразие связывающих белковых сайтов определяет тип взаимодействия ферментов с асимметричной мембраной и может приводить либо к адсорбции протеинов на поверхности мембран, либо к их встраиванию в бислой. В последнем случае может наблюдаться каналоподобная активность и новые белковые домены могут вовлекаться в этот процесс. Любые модификации немедленно отражаются на электрических свойствах липидного бислоя и применение различных современных разновидностей флуоресцентной микроскопии, которая как известно является наиболее мощным техническим средством визуализации супрамолекулярных отношений, позволяет подробно исследовать липид-белковые взаимодействия и такие сложные вопросы, как липидный рафт и топологию встраивания протеинов в бислой [Schuck S., et al., 1990; Sengupta P., et al., 2007; Shah M. & Sehgal P., 2004].

Прогресс в токсикологических исследованиях последних лет обусловлен постоянной разработкой новых подходов для идентификации всех составляющих сложного коктейля биологически активных веществ, каким являются все известные зоотоксины. Развитие биохимических методов анализа, таких как обращенно-фазная хроматография, N-концевой секвенсинг изолированных протеиновых фракций, **MALDI-TOF** масс-спектрометрия в геле посредством триптического гидролиза, наноспрей-ионизирующей **CID-MS/MS** масс-спектрометрии заряженных ионов и многих новейших компьютерных программ идентификации протеиновых молекул по их структуре и аминокислотным последовательностям (**BLAST**, **MASCOT**), позволяет быстрыми темпами заполнять пробелы в базах данных протеиновых структур, таких как **UniProt knowledgebase (SwissProt release 55.2 и TrEMBL Release 38.2 от 08.04.2008)** [Calvete J. et al., 2004-2010; Fry B., 2004-2006]. Надо отметить, что наличие в ядах змей веществ со схожей первичной структурой, которые проявляют высокую избирательность при взаимодействии с биологическим субстратом, делает их отличными биотехнологическими инструментами для изучения структурно-функционального аспекта физиологических процессов [Qian B. & Pollard J., 2010].

В то же время еще и сегодня интоксикации при змеиных укусах являются причиной около 125 000 смертей в год, и не только в странах третьего мира, но и в развитых странах. Как сообщает пресс-служба Всемирной Организации Здравоохранения, по оценкам экспертов, ежегодно происходит 5 миллионов случаев змеиных укусов людей, из них регистрируется 2,5 миллиона случаев поражения ядом, по меньшей мере, 100 000 случаев смерти и примерно втрое большее число случаев ампутаций и других видов пожизненной инвалидности. Укусы ядовитых змей могут вызывать паралич, который может приводить к остановке дыхания; нарушению свертываемости крови, что, в свою очередь, может привести к смертельному кровотечению; необратимую почечную недостаточность; и тяжелые повреждения тканей. Все эти факторы являются предпосылкой глубокого интереса со стороны научного сообщества к токсинам змеиного яда и их

физиологическому действию на человеческий организм [Kochva E., 1987; Koh D. et al., 2006].

Цель исследования. Целью настоящего исследования явилось определение протеомикса, мембранотропных и токсикологических свойств ядов Закавказской гюрзы и Армянской гадюки, которые будучи эндемичными представителями фауны Армянского нагорья, до сих пор были исследованы неполно и могут представлять большой интерес для отечественной фармакологии.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Определить полный биохимический состав ядов змей *Macrovipera lebetina obtusa* (Закавказская гюрза) и *Montivipera raddei* (Армянская гадюка) и идентифицировать все их составляющие.
2. Изучить влияние исследуемых ядов на состояние процессов перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной ферментативной защиты организма от окислительной деструкции в различных тканях.
3. Исследовать мембранотропное действие ядов гадюковых Армянского нагорья и различных изоформ фосфолипазы A2 в составе данных ядов с использованием разнообразных моделей бислойных мембран.
4. Дать кинетическую оценку связывания уникальных по своей структуре коротких дезинтегринов из яда Закавказской гюрзы с клеточными рецепторами по методу биосенсоров на основе Поверхностных акустических волн.
5. Исследовать сравнительную токсичность ядов гюрзы и армянской гадюки против активности существующей коммерческой противогадюковой сыворотки производства Загребского института иммунологии, которая применяется в отечественных клиниках против укусов указанных змей.
6. Изучить геморрагические и протеолитические свойства ядов закавказской гюрзы и армянской гадюки и их иммунологическое сходство с ядом носатой гадюки, который лежит в основе противозмеиной сыворотки – продукта Загребского института иммунологии.

Научная новизна работы.

1. Впервые установлен полный биохимический состав ядов закавказской гюрзы и армянской гадюки и проведен сравнительный анализ ядов трех подвидов гюрз, который позволяет предложить исследуемый подвид гюрзы как отдельный вид гадюковых.
2. Впервые разработаны и применены биофизические методы исследования окислительных свойств зоотоксинов на различных моделях бислойных липидных мембран.
3. Впервые использованы биосенсоры на основе поверхностных акустических волн для оценки связывания выделенных протеинов из яда гадюковых с клеточными рецепторами.
4. Методом биосенсоров на базе поверхностных акустических волн впервые показано наличие интегринов $\alpha 1\beta 1$ и $\alpha_v\beta_3$ в мембранах эритроцитов.
5. Впервые изучена кросс-реактивность противогадюковой сыворотки производства Загребского института иммунологии при нейтрализации

геморрагических и протеолитических поражений, вызванных ядами Закавказской гюрзы и Армянской гадюки.

6. Впервые разработан подход по изучению мембранотропных свойств ядов гадюковых, основанный на моделировании искусственных бислойных мембран из тканей организма, подвергнутого интоксикации змеиными ядами.

Практическая значимость работы. На основании результатов проведенного сравнительного биохимического исследования ядов трех подвидов гюрз *Macrovipera lebetina obtusa*, *Macrovipera lebetina turanica* и *Macrovipera lebetina transmediterranea* обоснована целесообразность проведения молекулярно-систематических исследований с целью выделения Закавказского подвида гюрзы в новый вид гадюковых *Macrovipera obtusa*.

Результаты исследования кросс-реактивности противогадюковой сыворотки производства Загребского института иммунологии при нейтрализации геморрагических и протеолитических поражений, вызванных ядами Закавказской гюрзы и Армянской гадюки, указывают на необходимость разработки и производства моно/поливалентных противозмеиных препаратов против ядов собственно наших видов гадюк, так как имеющиеся в наличии сыворотки намного слабее нейтрализуют фармакологический эффект, вызванный укусом указанных подвидов; и, в то же время, являются сильными аллергенами для ослабленного интоксикацией организма жертвы из-за иммунологического несоответствия ядов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Наиболее полная идентификация протеинов в составе исследуемых ядов современными методами биохимического анализа позволяет не только интерпретировать специфику фармакологического эффекта яда на организм, но и определить систематический статус змеи.

2. Моделирование *in vivo* мембранотропных реакций различных тканей организма при интоксикации подопытных животных посредством искусственных мембранных структур, позволяет визуализировать поражения липидных бислоев и вызванные ими морфологические деформации клеточных мембран.

3. Изменение интенсивности процессов перекисного окисления и генерации активных форм кислорода при *in vivo* воздействии ядом гадюковых, влечет за собой сбои системы антиоксидантной ферментативной защиты от окислительной деструкции не только в пораженных тканях, но и в масштабах всего организма, и данные токсикологические изменения носят характер т.н. “жертва-специфичности”.

4. Применение биосенсоров на основе поверхностных акустических волн позволяет отметить удобство использования данного метода для экспериментов по определению кинетики субстрат-лигандного связывания и кинетических показателей аффинности. По указанным данным метод хорошо коррелирует с результатами методов проточной цитометрии и поверхностного плазмонного резонанса по чувствительности (0.5 пг/мм^2), и при этом лишен ограничений, которые часто налагает последний для скрининга малых молекул.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на следующих международных научных конференциях:

- 9th International Summer School of Biophysics “Supramolecular structure and function”, 16-28 Sep, 2006, Rovinj, Croatia;
- “2nd biology of the vipers conference”, 24-27 Sep, 2007, Porto, Portugal;
- 33th FEBS Congress & 11th IUBMB Conference, 28 June-3 July 2008, Athens, Greece;
- 34th FEBS Congress, Prague, 4-9 July 2009;
- 7th EBSA Congress July 11-16 2009, Genoa, Italy;
- “Solvation and Ionic Effects in Biomolecular Recognition: Theory to Experiment”, May 17-21, 2010, Tsakhkadzor, Armenia;
- 4th ISN Special Conference “Membrane domains in CNS Physiology and Pathology”, Sicily, Italy, 22-26 May, 2010;
- Joint EUROMAR 2010 and 17th ISMAR Conference “WWMR2010”, Florence, Italy, 4-9 July, 2010;
- 17th Congress of the European Section of the International Society on Toxinology. 11-15 Septiembre, Valencia, 2011;
- 17th World Congress of the International Society on Toxinology & Venom Week 2012, 4th International Scientific Symposium on All Things Venomous, Honolulu, Hawaii, July 8 - 13, 2012;
- “Third Jubilee International Conference of Neuroscience and Biological Psychiatry”, September 22-24, 2013, Yerevan, Armenia;
- XI Congress of the Pan American Section of the International Society on Toxinology and the XII Congress of the Brazilian Society of Toxinology. The theme of the meeting is "Envenomation by poisonous animals: a neglected disease", 3-8 November 2013, Guarujá, Brazil

Публикации. По теме диссертации опубликовано 45 научных работ, в том числе 22 статьи и 23 тезисов докладов на международных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов, глав с изложением собственных исследований, их обсуждения, заключения и выводов. Работа изложена на 219 страницах текста, иллюстрирована 16 таблицами и 55 рисунками. Список цитированной литературы включает 411 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обоснованы актуальность темы исследования, цель и задачи, научная новизна и практическая значимость работы, а также основные положения, выносимые на защиту.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы включает подробный анализ современных представлений о химии и биохимии змеиных ядов и современных методов исследования протеомика, характеристику механизмов мембранотропных эффектов изучаемых соединений, данные о способах применения флуоресцентных маркеров для определения пластических свойств и состояния мембран и липидного рафта, а также принципы явления поверхностных акустических волн и их применения в исследованиях лиганд-рецепторного связывания в биологических наноструктурах.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Экспериментальный материал

В исследовании использовали яды змей *Macrovipera lebetina obtusa*, *Montivipera raddei*, *Naja kaoutia*, *Vipera ursinii renardi*, *Vipera ammodytes ammodytes*, *Bothrops asper*, *Echis carinatus* (*E.c. sochureki* или *E. sochureki*).

Выделение фосфолипидов и очищенных протеолипидов мозга. Экстракцию липидов из животных тканей проводили по методу Кейтса [1972]. Протеолипиды извлекали из липидного экстракта мозга методом эмульгирования-центрифугирования [Забелинский, Помазанская, 1984]. Его можно поделить на три этапа: 1) получение липидного экстракта, 2) получение неочищенных ПТЛ (НПЛ), 3) получение очищенных ПТЛ (ОПЛ). Определение содержания белка в липидном экстракте, НПЛ и ОПЛ из целого мозга крысы показало, что на втором этапе, т.е. при получении НПЛ, происходит значительная потеря ПТЛ белка (51% исходного количества). На третьем этапе при отмывке спирт-эфиром (1:1 об/об) НПЛ и получении ОПЛ эти потери меньше (13% белка в НПЛ). По данным хроматографии содержание фосфолипидов в гомогенате и ОПЛ целого мозга млекопитающих резко отличаются по процентному составу фракций, а именно ОПЛ сильно обогащены фосфатидилсерином и дифосфоглицерином и обеднены фосфатидилэтаноламином.

Формирование БЛМ и гигантских униламеллярных везикул. Бислойные мембраны из общей фракции липидов формировали по методу Мюллера [1962]. Гигантские бислойные везикулы (GUVs) получали модифицированным методом электроформации [Angelova et al., 1992]. Везикулы формируются следующим образом: ~2 мкл базового раствора липидов наносится на каждый из двух платиновых электродов в атмосфере жидкого азота. Затем с электродов удаляются следы органического растворителя посредством высушивания в течение ~1 ч. Ячейка и буфер (Трис-HCl 0.5 mM, pH 7.4) предварительно выдерживаются при температуре выше фазового перехода липидной смеси (~10°C), после чего добавляется 2мл буфера. Сразу после этого электроды подключаются к генератору низко-частотного переменного тока (10Гц с амплитудой 2В) на 90 мин. Приблизительный диаметр получаемых таким способом липосом (GUV) ~до 300 мкм, как описано у Bagatolli [Bagatolli and Gratton 2000].

Выделение синапсом и митохондрий. Выделение интактных митохондрий из печени крыс производили по методу Мосоловой с соав. [1975]. Выделение синапсом из мозга крыс производили по методу Хайоша с соав. [1975]. Получается три фракции (слоя): верхний плотный слой меланина, средний – взвесь синапсом и нижний – митохондрии.

Получение эритроцитарных теней. Наиболее «мягким» способом выделения эритроцитарных «теней» является метод, в котором используется осмотический гемолиз и отмывка мембран в гипотоническом буфере (метод Доджа) [Dodge, J., 1965]. Тени эритроцитов, полученные путем гипоосмотического гемолиза и отмытые от гемоглобина в гипотоническом буфере, содержат около 50 % белков, 43 % липидов и 7 % углеводов. Основная часть углеводов (93 %) связана с белками, остальная – с липидами. Отношение белков к липидам составляет величину 1,1 (например, для миэлина это отношение равно

0,23, а для внутренней мембраны митохондрий – 3,2). Масса одной эритроцитарной мембраны составляет 1,1–1,2·10⁻¹⁴г, толщина – около 6нм. Эритроциты выделяли из донорской крови путем отделения их от плазмы посредством центрифугирования.

2.2.Биохимические методы исследования змеиных ядов

Выделение протеинов яда. Для обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии 0.5-2мг лиофилизированного яда растворяли в 100мкл 0.05% трифторуксусной кислоты (ТФУ) и 5% ацетонитрила, нерастворимый осадок удалялся посредством 10 минутного центрифугирования в Eppendorf при 13 000g при комнатной температуре. Протеины из раствора разделяли посредством системы ETTAN LC-HPLC (Amersham Biosciences) и колонок Technokroma RP300 C₁₈C₁₈ (250x4мм, 5мкм размер), элюировались при 1мл/мин с линейным градиентом 0.1% ТФУ в воде (p-p А) и ацетонитрила (p-p Б): 5% Б -10мин, затем 5-15%Б около 20 мин, 15-45% Б – 120мин и 45-70% Б – 20мин. Определение белков проводили при 215нм, пики собирались вручную, после чего высушивались в Speed-Vac (Savant). Относительное содержание различных семейств протеинов (% от общего количества белка в яде) определяли как соотношение сумм участков RP-хроматографических пиков белков из одного семейства к общему количеству пиков [Sanz L., et al., 2008].

Идентификация выделенных протеинов. Отдельные белковые фракции были подвергнуты N-концевому секвенированию, согласно инструкции производителя (ProCise Instrument, Applied Biosystems, Foster City, USA). Сходство аминокислотных последовательностей определяли по существующей базе данных BLAST или BLAST-MS в <http://www.bork.embl.de/j/>. Молекулярный вес выделенных белков определяли при помощи SDS-PAGE (на 12-15% полиакриламидном геле) и электроспрей-ионизирующей (ESI) масс-спектрометрии с использованием Applied Biosystems QtrapTM масс-спектрометра, работающего в режиме усиленного множественного заряда (Enhance Multiple Charge) в диапазоне m/z 600-1700.

MALDI-TOF (ферментативное расщепление в геле и метод идентификации белков по т.н. «отпечаткам пептидных масс»). Отдельные белковые полосы отделяли посредством иссечения из SDS-PAGE геля, окрашенного кумассиновым бриллиантовым синим; затем восстанавливали дитиотрейтолом и алкилировали йодоацетамидом, после чего производился триптический гидролиз в геле с использованием трипсина из бычьей поджелудочной железы (Roche) и ProGest дайджестором (Genomic Solutions) по протоколам производителя. 0.65мкл смеси белок-трипсин общим объемом ~20мкл капали на держатель пробы **MALDI-TOF**, смешивая с таким же объемом насыщенного раствора α-циано-4-гидроксикоричной кислоты (Sigma) в 50% ацетонитриле, содержащем 0.1% ТФУ, после чего высушивали и анализировали на Applied Biosystems Voyager-DE Pro MALDI-TOF масс-спектрометре. В качестве калибровочного стандарта для масс использовалась ранее охарактеризованная смесь пептидов из лектинов семян южноамериканской лианы *Cratylia floribunda* (код в SwissProt - P81517, диапазоны молекулярного веса 450-3300 Да) [Calvete J., et al., 2010].

Наноспрей-ионизирующая CID-MS/MS масс-спектрометрия. Для определения аминокислотных последовательностей пептидов, расщепленные трипсином смеси

помещались в наноспрей-капиллярные колонки и подвергались электроспрей-ионизирующей масс-спектрометрии с использованием установки QTrap (Applied Biosystems) с дополнительной насадкой наноспрей (Protana, Denmark). Метод Усиленного разрешения, примененный в данном анализе был в пределах 250 а.е.м./с (1 а.е.м. / с = $1.66053892 \times 10^{-27}$ кг / с), а остальные параметры MS/MS экспериментов следующие: Q1-единица разрешения; Q1-к- Q2 энергия столкновения – 30-40эВ; Q3 входной барьер – 8В; LIT (linear ion trap) – Q3 время заполнения – 250мс; Q3 скорость сканирования - 1000 а.е.м./с. CID-спектры обрабатывались при помощи программы MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) [Le Blanc J., et al., 2003].

Определение степени сходства белковых составов ядов. Использовался коэффициент сходства, который используется для сравнения индивидуальных генетических профилей на основе последовательностей мультислокусной ДНК [Wetton J., et al., 1987]. Коэффициент сходства (PSC – protein similarity coefficient) протеинов а и b определялся по следующей формуле:

$$PSC_{ab} = [2x (\text{количество пептидов, не повторяющихся у а и б}) / (\text{общее количество индивидуальных протеинов у а} + \text{общее количество индивидуальных протеинов у б})] \times 100$$

2.3.Биофизические методы исследования змеяных ядов

Метод ХЛ-анализа. Изучение ХЛ в наших экспериментах проводилось на разработанной и собранной на кафедре биофизики ЕГУ квантометрической установке, работающей на базе ФЭУ-139. Для периодического метрологического контроля чувствительности квантометрической установки применялся специальный эталон из стекла ЖС-19 (ГОСТ 9411-18) с максимумом излучения 500-600нм. По данным этого эталона чувствительность нашей установки составляет 6,8·10Е/лм, что не меньше чем у известных фирменных аналогов таких установок. Так, описываемые эксперименты были продублированы на установке LB 9509 Portable Tube Luminometer производства BERTHOLD Technologies (Германия) [Закарян А., и др., 1990; Айвазян Н., 2008].

Определение ПОЛ. Перекисное окисления липидов изучали по накоплению продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой [Brugger B. et al., 2000; Стальная И., Гаришвили Т., 1977]. Полученные результаты выражены в нмолях на пробу.

Определение активности супероксиддисмутазы. Применяемый метод основан на способности СОД тормозить реакцию автоокисления адреналина при рН 10,2 [Макаревич О., Голиков П., 1983]. Измерение автоокисления адреналина в адренохром проводили при длине волны 480 нм.

Определение активности глутатион-пероксидазы. Активность глутатионпероксидазы определяли по скорости уменьшения содержания НАДФН в инкубационной пробе при 340 нм. За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для окисления 1 мкмоль глутатиона в 1 мин. При расчетах использовали коэффициент молярной экстинкции для НАДФН, равный 6,22 [Paglia D. & Valentine W., 1967].

Определение общей пероксидазной активности. Так называемую гваякол-пероксидазную активность в тканях определяли по методу [Harauchi T. & Yoshizaki T., 1982]. Метод основан на способности гваякола окисляться перекисью водорода при активном участии пероксидаз. При расчетах использовали коэффициент молярной экстинкции для гваякола, равный 25 500л/моль·см.

Метод фиксации напряжения. Измерение и определение некоторых электрических параметров БЛМ проводили на собранной в лаборатории ЕГУ установке с электрометрическим усилителем обратной связи “Keithley 301” (США). Исследование электрических параметров осуществлялось методом фиксации напряжения, суть которого заключается в поддержании мембранного потенциала на любом уровне независимо от ионных потоков. После чего вычислялось собственное сопротивление мембраны по следующей формуле:

$$R_m = R_f U_m / U_f$$

Потенциал разрыва БЛМ определялся как пороговое значение монотонно подаваемого напряжения, при котором мембрана разрывается. Все эксперименты проводились в экранированной камере [Ayvazyan N., et al., 2011; 2012].

Флуоресцентная микроскопия. Изображения записывались посредством эпифлуоресцентного микроскопа AMScope (USA), по методу So et al. [1995] при помощи цифровой камеры FM320-5M. Белки добавлялись в буфер как до, так и после формирования везикул (0.5 mM Tris pH = 7.4) в зависимости от схемы эксперимента. Для всех опытов со связыванием белков изображения везикул отбирались после добавления во взвесь липосом АНС. Изменения в режиме реального времени (видеозапись) наблюдались после добавления ядов и отдельных токсинов в среду образца прямо под микроскопом.

Измерение GP-факторов LAURDAN-a и PRODAN-a. Фазовые состояния липидных доменов определяли при помощи PRODAN-метки, которая связывается преимущественно с липидами в жидкой фазе [Bagatolli and Gratton, 2000]. LAURDAN же используется в качестве мембранной пробы из-за своей способности соотноситься со степенью проницаемости бислоя для воды. Пик спектра испускания обоих зондов (как LAURDAN-a, так и PRODAN-a) в моногенном бислое приходится на область 490 нм, когда мембрана в состоянии геля и на область 440 нм, когда она находится в кондиции жидкого кристалла. GP-фактор – это удобное математическое количественное выражение интенсивности испускания:

$$GP = \frac{I_B - I_R}{I_B + I_R}$$

где I_B и I_R интенсивности синего (440 нм) и красного (490 нм) свечения, соответственно.. Полное описание математического значения GP-фактора можно найти в литературе [Bagatolli and Gratton, 1999].

Измерение параметров биомолекулярных взаимодействий по технологии поверхностных акустических волн. Методика основана на технологии Поверхностных Акустических Волн в биосенсорах, запатентованной компанией SAW Instruments. Сенсор – это чип, обычно с золотым покрытием, состоящий из нескольких независимых сенсорных элементов с модифицирующими агентами (COOH SAM; OH SAM; CH₃ SAM; NH₂ SAM; карбоксиметилдекстран с длинными и короткими цепями; стрептавидин декстран; белок A/G декстран), на поверхности которого возбуждают акустические колебания. В зависимости от исследования на сенсорной поверхности можно иммобилизовывать разнообразные лиганды и анализируемые субстанции, которые специфически связываются с поверхностью сенсорного чипа. Изменения в покрытии поверхности отражаются в измеряемом сигнале, в зависимости от времени, а константы ассоциации и диссоциации извлекаются для кинетических расчетов [Al-Kaddah S., et al., 2010; Andra J., et al., 2008].

Иммобилизация теней эритроцитов и GUV на поверхности чипа. Тени эритроцитов и липосомы иммобилизовывали на поверхности $\text{CH}_3\text{-SAW}$ (неспецифическое связывание; положительно заряженная поверхность). Мобильной фазой являлись дизинтегрины в фосфатном буфере (pH 7.4), скорость потока – 20мкл/мин. Кинетические константы связывания для определения аффинности в состоянии равновесия K_D по модели связывания 1:1 рассчитывались по наклону кривой.

$$K_D = k_{\text{off}} k_{\text{on}}^{-1},$$

где k_{off} (с^{-1}) – константа скорости диссоциации, а k_{on} ($\text{конц}^{-1}\text{с}^{-1}$) – константа скорости ассоциации. Для анализа использовался трехкомпонентный пакет программного обеспечения, предоставляемый фирмой-производителем.

2.4. Определение токсичности и кросс-иммунизация

Экспериментальные животные для *in vivo* экспериментов. Все эксперименты с животными проводились по Хорватскому Закону о Благополучии Животных [2013], который строго следует директиве ЕС 2010/63/EU. Для определения летальной токсичности и ее нейтрализации использовались мыши (18-20г) NIH Ola/Hsd линии Института Иммунологии г.Загреб (Хорватия). Взрослые крысы линии Льюис для определения геморрагической активности и ее нейтрализации также являлись продукцией того же Института.

Определение летальной токсичности ядов и степени ее нейтрализации. Летальную токсичность, выраженную средней летальной дозой, определяли по методу Текстона и Рида (1983), а также протоколу Европейской Фармакопеи (Ph.Eur.01/2008:0145). Результаты приведены как усредненные данные по меньшей мере пяти определений $\pm$ стандартная ошибка (SE). Среднюю эффективную дозу (ED50), выражающую количество неразбавленного противоядия (в мл), способное нейтрализовать летальность применяемой дозы яда на 50%, рассчитывали по методу Сперман-Кербера. Защитная эффективность (R) выражается числом ЛД50 доз, которое может быть нейтрализовано 1мл неразбавленной Загребской противоземной сыворотки и рассчитывается следующим уравнением:

$$R = (T_v - 1) / ED50,$$

где T_v – количество ЛД50 доз, полученных отдельной мышью.

Определение геморрагической активности ядов и степени ее нейтрализации. Геморрагическую активность, выраженную в минимальной геморрагической дозе (MHD), определяли по методу Текстона и Рида [1983], в модификации Ланг Баля [2005]. Крысы получали инъекцию яда (по 100мл в дозировках от 1.28 до 5мг); через 24 часа кожа удалялась, и определялся диаметр геморрагического поражения на внутренней поверхности. За минимальную геморрагическую дозу принималось то наименьшее количество яда (мг на сухой вес), которое приводило к образованию 10мм-ого поражения.

Загребское противоядие (в разведениях 2-, 5-, 10-раз) инкубировали 30минут при 37°C с таким же объемом яда (концентрация раствора - 1мг/мл) и 100мл смеси вводилось двум группам крыс. В качестве негативного контроля использовался раствор без противоядия. Опять же удаляли кожу через 24 ч., измеряли диаметр геморрагического поражения и результат усредняли для каждой дозы. Далее рассчитывали MHD по формуле

$$[(Pv-Pv+av)/Pv] \times 100 \pm SE,$$

где Pv – среднее значение поражения поверхности ядом, а Pv+av - среднее значение поражения поверхности смеси яда с противоядием.

Определение протеолитической активности ядов и степени ее нейтрализации

Азоказеинолитическая активность яда и ее нейтрализация. Протеолитическую активность яда измеряли калориметрически с использованием азоказеина в качестве субстрата по модифицированному методу Хорхе-да-Силва и Эйрд [2001], в модификации Куртович и соав. [2012]. Дополнительно, протеолитическую активность также определяли в присутствии ингибиторов Na₂EDTA (5 ммоль/дм³) и/или Pefabloc (1 ммоль/дм³ для ядов MR и VAA и 2 ммоль/дм³ для яда MLO), преинкубируя яд с ними по 30 мин при 37°C за час перед добавлением субстрата. Скорость реакции с интактным ядом принимали за 100% протеолитическую активность, а при ингибировании соотносили с ней.

Нейтрализацию азоказеинолитической активности определяли, используя сыворотку кроликов, иммунизированных цельным ядом носатой гадюки по следующей схеме: двукратно разведенную противозмеиную сыворотку преинкубировали с таким же объемом яда (2 мг/мл) или раствором яда, обработанного Pefabloc (2 ммоль/дм³). После удаления иммунных комплексов, определялась остаточная протеолитическая активность в аликвотах супернатанта (35 мкл), как описано выше. Негативным контролем служила сыворотка не-иммунизированных кроликов.

Амидолитическая активность яда и ее нейтрализация. Амидолитическую активность яда тестировали при помощи Nα-бензоил-Фен-Вал-Арг-*p*-нитроанилид. При 5-минутной инкубации при 37°C измеряли абсорбцию при 382 нм с интервалами в 15 с с построением линейной временной зависимости. Уклон кривой позволяет судить о скорости энзиматической и определять амидолитическую активность яда. Дополнительно, протеолитическую активность также определяли в присутствии ингибиторов Na₂EDTA (5 ммоль/дм³) и/или Pefabloc по вышеописанной схеме.

2D иммуноблоттинг белков яда Загребской противозмеиной сывороткой. Изоэлектрическую фокусировку ядов проводили в ZOOM IPGRunner Mini-Cell (Invitrogen, USA) с использованием иммобилизованных pH-градиентных полосок (IPG; 7 см длиной, pH 3-10), предварительно дегидрированных белковыми пробами (250 мкг). Далее применялся следующий протокол напряжений: 20 мин 200V, 15 мин 450 V, 15 мин 750 V и 180 мин 2000 V. Фокусированные IPG уравнивались вначале DTT (20 ммоль/дм³) и затем йодоацетамидом (125 ммоль/дм³) при комнатной температуре в течение 15 мин. Остановка реакции производилась 5% нежирным молоком в PBS/T буфере при 4°C (экспозиция – вся ночь). Окрашенные мембраны вначале инкубировались Загребским противоядием (1000000-кратное разведение), затем кроличьей анти-лошадиной F(ab')₂ сывороткой (в 10000-кратном разведении) и, наконец, с HRP-анти-кроличьим IgG (в 10000-кратном разведении). Каждая из указанных инкубаций проводилась при комнатной температуре в течение 2 часов. ECL Prime Western Blotting Detection Reagent применялся для выявления белков по протоколу производителя (GE Healthcare, USA).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1.Протеомикс ядов

Результаты масс-спектропии (MS-MS). По аналогии с проведенными ранее анализами протеомикса змеиных ядов в лаборатории проф. Х. Кальвете (Валенсия) [9, 20-22], яд змей *M.l.obtusa* и *M.raddei* также можно по составу белковых компонентов подразделить на несколько групп (9 и 11, соответственно), которые представлены в таблице 1. В сравнительном аспекте можно их сгруппировать в две неравномерные группы: компоненты, содержащиеся в обоих ядах данных горных гадюк; и компоненты, уникальные для каждого из ядов (Рис. 4). Общими для обоих являются брадикинин-потенцирующие/С-натриуретические пептиды, димерные дезинтегрины, DC-фрагменты, CRISP, фосфолипаза A₂, сериновые протеиназы, лектины С-типа, оксидаза L-аминокислот, семейство Zn²⁺-металлопротеаз, хотя соотношение относительного содержания последних сильно различается в изучаемых ядах. Специфическими и характерными компонентами являются короткий дезинтегрин обтустатин для ады *M.l.obtusa* и Kunitz-типе ингибитор сериновых протеиназ и VEGF-подобные молекулы для ады *M.raddei*.

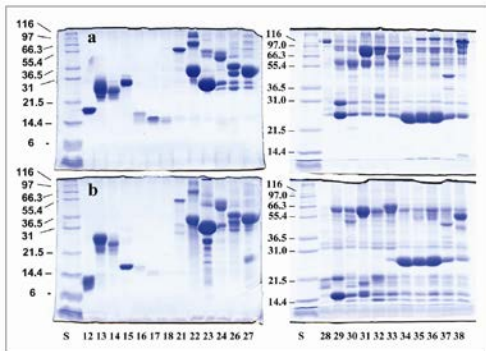
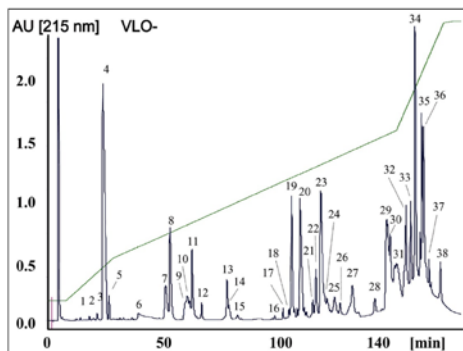


Рис. 1. Хроматографическое фракционирование (RP-HPLC) яда *Macrovipera lebetina obtusa*. Обращенно-фазное разделение яда *Macrovipera lebetina obtusa* в SDS-полиакриламидном геле.

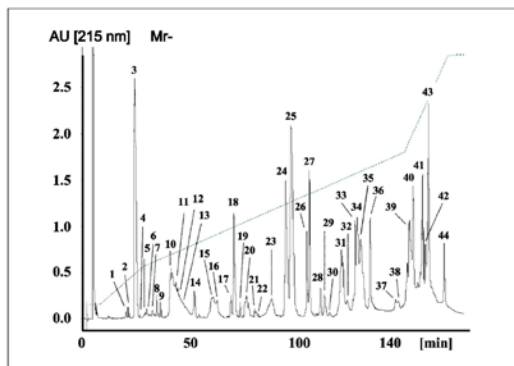


Рис. 2. Хроматографическое фракционирование (RP-HPLC) яда *Montivipera raddei*

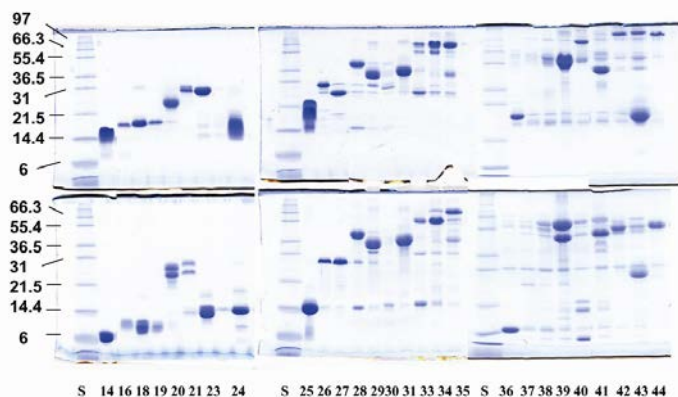


Рис. 3. Обращенно-фазное разделение яда *Montivipera raddei* в SDS-полиакриламидном геле.

Таблица 1. Сравнительное содержание основных групп протеинов в ядах *Macrovipera lebetina obtusa* и *Montivipera raddei*.

Семейство протеинов	% кол-во протеинов яда		
	<i>M.l.obtusa</i>	<i>M.l.transmediterranea</i>	<i>M. raddei</i>
ВПП/С-NP	5.3	<1	6.0
Димерный дезинтегрин	8.5	6	9.7
Короткий дезинтегрин	2.8	<1	-
Ингибитор типа Kunitz	-	-	0.9
DC-фрагменты	1.7	1	0.1
svVEGF	-	2	2.4
CRISP	2.6	-	7.4
PLA ₂	14.6	4	23.8
Сериновые протеиназы	14.9	9	8.4
Лектиноподобный С-тип	14.8	10	9.6
Оксидаза L-аминокислот	1.7	-	0.2
Zn ²⁺ -металлопротеиназа	32.1		31.6
(PIII	4.3	67	26.4
PI	27.8		5.2)
Для сравнения, состав токсина яда <i>M.l. thansmediterranea</i> показан в таблице.			

Полный биохимический состав яда по данным Maldi-TOF. Полное число составляющих, на которые получилось разделить исследуемые яды составило 38 белков в яде закавказской гюрзы (*Macrovipera lebetina obtusa*) и 44 в яде Армянской гадюки (*Montivipera raddei*), что свидетельствует о сложности состава указанных ядов в сравнении с ядами змей, находящихся в ближайшем родстве по своему систематическому статусу к данным подвидам (/видам) (Рис. 1-3). Яды данных змей содержат сложный коктейль из

протеинов, который призван вызывать широкий спектр нарушений нормального гомеостазирования организма, в особенности работы всей кровеносной системы. Возможно, такой большой разброс фармакологических эффектов этих токсинов связан с биотопом обитания данных подвидов змей, для которого необходим механизм быстрой иммобилизации жертвы в условиях горно-скальных экосистем. В частности, этим обусловлено крайне богатое содержание BPPs и C-NAP белков, первичная структура которых была выявлена посредством Эдмановской деградации. C-NAP белки из яда *M.l.obtusa* и *M.raddei* демонстрируют, соответственно, 89% и 66% сходства аминокислотных последовательностей с белко-ингибитором агрегации из яда *M.l.transmediterranea* [1Q01, <http://www.rcsb.org/pdb>]. BPPs же были впервые описаны как белки-ингибиторы (из змеиного яда) ангиотензин-конвертирующего фермента – дипептидилкарбоксипептидазы, который синтезируется в эндотелиальных, эпителиальных и нейроэпителиальных клетках. Последний конвертирует неактивный ангиотензин I в сильный вазоконстриктор ангиотензин II, и может расщеплять брадикинин в брадикинин (1-7) либо в брадикинин (1-5) [Joseph S., et al., 2005]. Таким образом BPPs предотвращает гипертензивный эффект ангиотензина II и вызывает гипотензивную реакцию из-за циркулирующего в крови избытка брадикинина. В свою очередь C-NAP белки проявляют натриуретическую, диуретическую и вазорелаксантную активность. Вазодилляция и гипотензия при синергичном действии провоцируют быструю диффузию токсических веществ в циркуляторную систему и гипотензивный шок. Именно последний является основной причиной смерти жертвы при укусе большинства гадюк, а в случае горных гадюковых приводят к быстрому обездвиживанию жертвы, при котором она уже не может скрыться в скальных выступах и щелях. Змеи же пустынного биотопа могут позволить себе долго преследовать укушенную жертву, прежде чем наступит ее гибель.

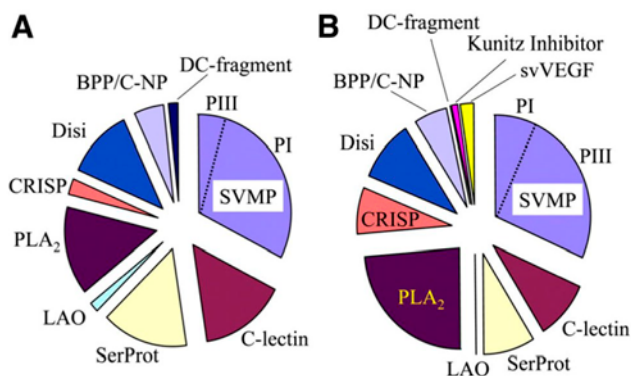


Рис. 4. Сравнительное содержание основных групп протеинов в ядах *Macrovipera lebetina obtusa* (A) и *Montivipera raddei* (B). BPP/C-NAP – брадикинин-потенцирующие белки и C- натриуретические пептиды; DC – дезинтегрин/цистеин-богатые пептидные фрагменты из P-III Zn^{2+} - металлопротеаз змеиного яда (SVMP); DISI – дезинтегрины; SerProt – сериновые протеиназы; LAO - оксидаза L-аминокислот; PLA₂ – фосфолипаза A₂ змеиных ядов; CRISP – цистеин-богатый секреторный белок.

В изучаемых ядах MLO-6a и MLO-6b, по-видимому, высвобождаются из одного прекурсора в ходе альтернативного протеолиза и содержат внутримолекулярные дисульфидные связи. BPP/C-NAP белки из яда Армянской гадюки демонстрируют намного более заметное структурное разнообразие (Таблица 2). Очевидно, что расщепление по крайней мере двух прекурсоров привело к образованию схожих Vr-4-Vr-9 и Vr-10-Vr-13 наборов белков. Vr-8 и Vr-11 представляют из себя наиболее длинноцепочечные варианты каждой из групп. Помимо этого, каждый из пептидов Vr-7 фракции является двумя полипептидными цепочками, ковалентно связанными межмолекулярным дисульфидным мостиком. Очевидно, расщепление внутримолекулярной связи $^{14}\text{KK}^{15}$ (согласно нумерации аминокислотных последовательностей в Vr-8) и привело к образованию данных конфигураций. Регулируется ли данный процесс в ходе образованию соответствующих пептидов и каково реальное биологическое значение подобного структурного разнообразия, пока не известно.

Таблица 2. Полные аминокислотные последовательности С-натриуретических пептидов из ядов *Macrovipera lebetina obtusa* (MLO-) и *Montivipera raddei* (Vr-).

HPLC fraction	Peptide sequence	(M+H ⁺) _{av} calculated
VLO-6a ^a	GLNKPPKRGPSDGCFGHKIDRIGSHSGLGCNKVDDNK	3901.9
VLO-6b ^a	GLNKPPKRGPSDGCFGHKIDRIGSHSGLGC	3088.4
Mr-4 ^a	HGNCGFGKKIDRINQGFGCNKVDDNDKG	3036.6
Mr-6 ^a	DNKPPHNGNCGFGKKIDRINQGFGCNKVDDNDKGKGGH	3966.8
Mr-7 ^b	KIDRINQGFGCNKVDDNDKG GDNKPPHNGNCGFGK	3664.3
Mr-7 ^b	KIDRINQGFGCNKVDDNDKGKGGH GDNKPPHNGNCGFG	3916.6
Mr-8 ^a	GDNKPPHNGNCGFGKKIDRINQGFGCNKVDDNDKGKGGH	4024.3
Mr-9 ^a	GDNKPPHNGNCGFGKKIDRINQGFGCNKVDDNDKG	3644.9
Mr-10 ^a	GENEPPNNSNCFGHRINRIGSVSGLGCNKVDDD	3512.6
Mr-11 ^a	GENEPPNNSNCFGHRINRIGSVSGLGCNKVDDNDKGKGGH	4193.6
Mr-12 ^{a,c}	GENEPPNNSNCFGHRIDRIGSVSGLGCNKVDDDDKG	3840.3
Mr-13 ^a	GENEPPNNSNCFGHRIDRIGSVSGLGCNKVDDDDKG	3818.1

Сравнительные характеристики состава яда по их протеомиксу. Используя коэффициент сходства, мы попытались определить процент идентичности белкового состава ядов трех подвидов гюрз: тунисской, закавказской и среднеазиатской (рис.5). Сравнительный анализ показал, что по крайней мере с одним из подвидов, а именно *M.l. transmediterranea* (Тунис), яд нашего подвида имеет менее 4% сходства, которое в основном ограничивается группой димерных дезинтегринов. Как свидетельствуют данные Таблиц 1 и 3 (протеомикс яда *M.l. transmediterranea* взят из 43) молекулы PLA₂ (продукт 6 генов в Mlo против продукта 1 гена в Mlt), сериновых протеиназ (9 белков в Mlo, 3 - в Mlt), лектины С-типа (2 гетеродимерные и 1 тетрамерная молекулы в Mlo против 3-х гетеродимеров в Mlt) и металлопротеазы сильно отличаются в ядах двух подвидов

Левантийской гадюки. К тому же в яде *M.l. transmediterranea* отсутствуют оксидаза L-аминокислот и CRISP, но есть VEGF-протеин, который не обнаружен в яде *M.l. obtusa*. Наконец, наличие PIV-SVMP и высокое содержание PI-SVMP у *M.l. obtusa*, в то время как, *M.l. transmediterranea* является PIII-SVMP-богатым ядом.

С другой стороны, обнаруженные нами белковые фракции Mlo-22-27, Mlo-29-32, и Mlo-38, по всей видимости, идентичны с сериновыми протеазами [Q8JH85, Q9PT40, Q7T041], фактором X – активатором PIV-SVMP [Q7T046] и димерной PIII-SVMP VLAIP-A [Q4VM08], соответственно. Данные белки были описаны группой Siigur (Таллин, Эстония) при анализе яда *M.l. turanica* из Узбекистана. Различия в составе ядов родственных таксонов различных географических регионов можно вполне объяснить

эволюционным давлением определенных факторов среды обитания на изолированные популяции. Однако, также такой разброс данных может свидетельствовать лишь о недостатке точных аминокислотных последовательностей в существующих базах данных. Так или иначе, сравнительный анализ RP-HPLC спектров ядно показывает большие качественные различия в составе ядов этих трех подвидов и, по крайней мере, для *M.l. obtusa* и *M.l. transmediterranea* позволяет делать определенные предположения о необходимости выделения данных двух таксонов в отдельные виды.

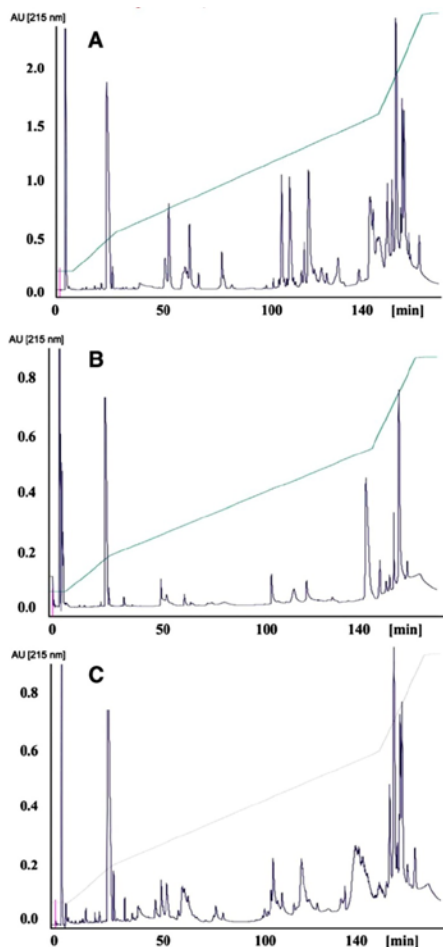


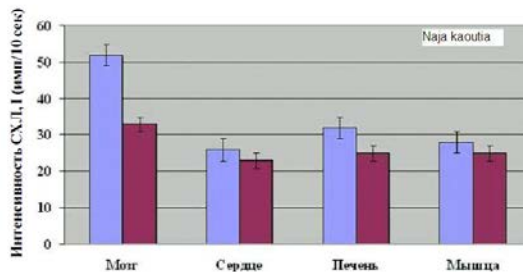
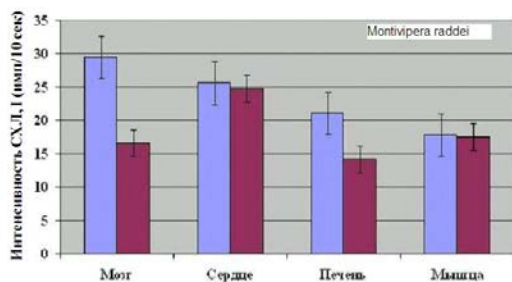
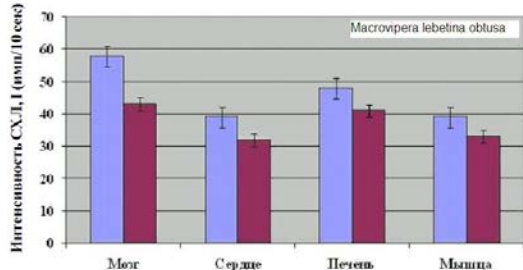
Рис.5. RP-HPLC профили ядов *Macrovipera*. Сравнительный анализ трех подвидов; *M. l. obtusa* (A) *M. l. transmediterranea* (B) и *M. l. turanica* (C).

Для большей убедительности такого предположения, мы проделали также сравнительный анализ ядов змей из двух различных популяций *M. raddei* на территории Армении, которые довольно сильно отличаются как фенотипом, так и биотопом. Как показали данные всех проведенных исследований составы ядов почти идентичны и показывают степень сходства до 98%! Мы отметили только единичное различие в димерном дезинтегрине 15, а также некоторое различие в относительном количественном содержании компонентов (например 31).

3.2. Антиоксидантный характер действия змеяных ядов

Сравнительный анализ динамических изменений процессов СРО в тканях при *in vivo* и *in vitro* обработке ядом гадюковых.

На начальном этапе экспериментов тканевые гомогенаты мозга, сердца, печени и мышц крыс, подвергнутых инъекции яда (укусу) изучали на предмет изменения интенсивности спонтанной хемилюминесценции, уровень которой позволяет судить о процессах свободнорадикального окисления липидов изучаемых тканей в режиме реального времени. Наличие яда гюрзы в организме (в



различных тканях) приводит к неоднозначному изменению уровней ХЛ при сравнении с ХЛ тканей контрольной группы крыс. Так, если в случае гомогенатов мозга имеет место интенсификация процессов СРО после укуса змеи, то в случае гомогенатов сердца мы наблюдаем не менее устойчивое падение уровня ХЛ в ткани. Что касается изменений указанных процессов в печени и поперечно-полосатой мускулатуре (не в области укуса), то, несмотря на некоторую тенденцию к увеличению ХЛ в первом случае и антиокислительному эффекту во втором, перекрывание доверительных интервалов не позволяет уверенно говорить о наличии эффекта.

Рис 6. Изменения уровней СХЛ гомогенатов тканей крысы при *in vitro* воздействии ядами змей (сверху вниз: гюрза, армянская гадюка, моноколевая кобра).

Проокислительный эффект яда был выявлен также в экспериментах по определению концентрации МДА в указанных тканях животных подвергнутых укусу змеи. Особенно это заметно в ткани головного мозга, где содержание продуктов перекисного окисления повышено почти вдвое по сравнению с их концентрацией в нормальных условиях. Наименьший эффект, как и в результатах ХЛ-анализа, наблюдается в скелетной мускулатуре, а в печени имеет место реверс результатов ТБК-теста в сравнении с уровнями интенсивности ХЛ.

Интересно, что влияние ядов как гадюковых, так и элапид на тканевые гомогенаты тех же органов крыс при обработке *in vitro* демонстрировали исключительно антиокислительный эффект компонентов яда как в случае ХЛ-анализа (рис. 6), так и при ТБК-тестировании накопления малонового диальдегида в качестве продукта процессов перекисного окисления липидов (таблица 3).

В заметном антиокислительном эффекте яда заключается видимое противоречие с классической теорией о том, что основным компонентом яда принято считать фермент фосфолипазу А₂, биологической функцией которого является т.н. “генерация” лизофосфолипидов: процесс, который сам, по себе напрямую связан с образованием липидных перекисей. Данное противоречие легко снимается при помощи экспериментов с очищенной фосфолипазой А₂, которая при воздействии на тканевой гомогенат мозга оказывает заметно-проокислительное действие и практически не меняет уровень свечения гомогената, если последний инкубируется с фосфолипазой S-49, которая не наделена ферментативной активностью (Рис. 7).

Таблица 3. Действие яда закавказской гюрзы на процессы свободно-радикального окисления липидов тканей крысы при их *in vitro* обработке ядом.

Ткань	Интенсивность ХЛ, нмп/сек		Концентрация МДА, нмоль/пробу	
	контроль	проба	контроль	проба
Мозг	58±4.18	43±2.78	2.3±0.08	1.67±0.05
Сердце	39±3	32±1.12	1.6±0.03	0.56±0.04
Печень	48±3.91	41±2.55	2.77±0.06	1.2±0.1
Мышца	39±1.58	33±1.22	1.5±0.04	0.53±0.04

Однако представленные в данной работе результаты анализа СРО процессов после *in vivo* обработки животных ядом, как нам кажется, позволяют говорить о сильном опосредованном действии компонентов токсина на отдельные органы в интактном животном, то есть об образовании вторичных не прямых продуктов, влияние которых на такие жизненно важные органы как мозг и сердце носит уже проокислительный характер. Современные указания научной литературы по данному вопросу в области физиологии, клиники и биохимии подтверждают правильность нашей догадки (например, влияние фосфолипазы А₂ на мембраны эритроцитов посредством образования более реакционно агрессивных “прямых” факторов лизофосфолипидов из мембран сосудистых и др. тканевых клеток) [Tatulian S., 2001].

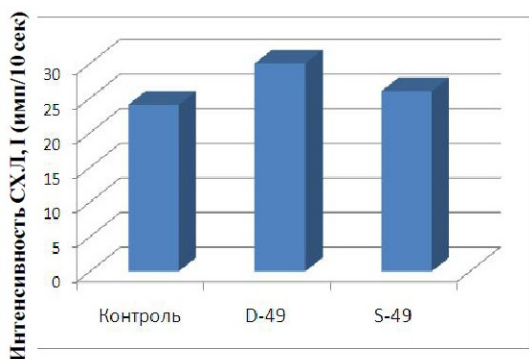


Рис. 7. Влияние ферментативной фосфолипазы A2 из *Macrovipera lebetina obtusa* (D-49) и неферментативной фосфолипазы A2 из *Vipera ursinii renardi* (S-49) на активность свободнорадикальных процессов в мозговой ткани млекопитающих ($P < 0.05$).

ХЛ-анализ процессов СРО некоторых супрамолекулярных липидных структур при действии змеиного яда (синаптосомы, митохондрии, тени эритроцитов, липосомы).

Как и в случае всех ранее проведенных экспериментов по *in vitro* воздействию ядов армянских гадюковых на процессы свободнорадикального окисления, здесь также имеет место исключительно антиоксидантный эффект (рис. 8), который однако наиболее сильно выражен в митохондриях печени и тенях эритроцитов.

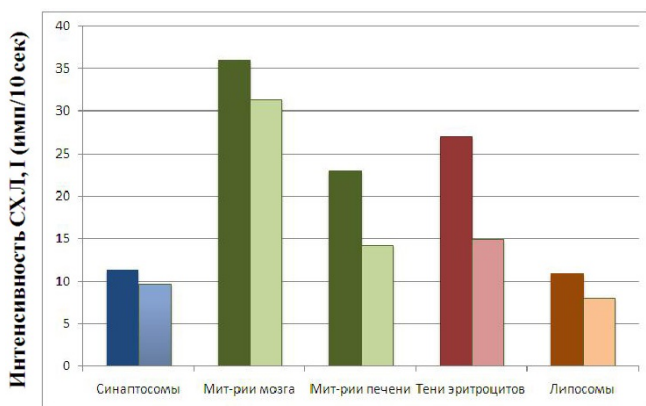


Рис.8. Влияние яда *Macrovipera lebetina obtusa* на активность свободнорадикальных процессов в некоторых липидных модельных структурах.

Активность ферментов антиоксидантной системы защиты (супероксиддисмутаза, глутатион-пероксидаза) в тканях позвоночных при действии змеиного яда. Изучение процессов перекисного окисления липидов интактного организма логически приводит к необходимости исследования активности компонентов антиокислительной ферментативной системы, работа которой призвана сбалансировать повреждающий эффект перекисидативных процессов в нормально функционирующем организме. Вот почему следующий этап наших исследований посвящен определению активности ферментов супероксиддисмутаза (СОД) и глутатион-пероксидаза (ГПО) в тканях белых крыс после введения яда гюрзы. Судя по характеру автоокисления адреналина в

адrenoхром на свету при высоких рН (10,2), активность фермента в организме животных, подвергнутых воздействию яда, сильно повышена в головном мозгу (более, чем в 2 раза) и в сердечной мышце (в 1.5 раза) по сравнению с обычным уровнем активности СОД у крыс контрольной группы. Тогда как в печени и мышцах активность СОД после укуса заметно подавлена. Следует отметить, что данные по активности указанного фермента и тенденциям изменения этого параметра при укусе змеи хорошо коррелируют с результатами ТБК-теста по определению концентрации МДА.

В то же время, реакция глутатион-пероксидазной системы защиты организма демонстрирует обратную корреляцию почти во всех исследуемых тканях. Так как глутатионпероксидаза (ГПО; К.Ф. 1:11.1.9.) катализирует реакцию детоксикации органических и неорганических пероксидов без образования свободных радикалов, используя в качестве донора водорода восстановленный глутатион, следовательно активность ГПО существенно зависит от концентрации данного субстрата, а следовательно от активности глутатионредуктазы (ГР) и уровня НАДФН в клетке.

Определение общей пероксидазной активности в исследуемых образцах до и после инъекции яда, позволяет говорить о всеобщем нарушении работы второй линии защиты организма от окислительной деструкции, к которым относятся уже различные пероксидазы и каталаза. Следует отметить, что каталаза преимущественно находится в пероксисомах (B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, 1989; R. Stocker, B. Frei, 1991), внеклеточно каталаза находится в незначительных концентрациях, и наибольшая активность каталазы в организме характерна для печени. Было установлено, что в эритроцитах при высокой скорости образования перекиси водорода (10^{10} - 10^9 моль H_2O_2 на 1 мг гемоглобина в 1 мин) преобладает активность глутатионпероксидазы, а при низкой скорости образования H_2O_2 (10^9 - 10^7) — защитное действие оказывает в основном каталаза.

Очевидная корреляция полученных нами данных для активности ГПО и общей пероксидазной активности позволяет говорить о сильном нарушении функционирования всей системы пероксидаз (и каталазы в том числе), причиной которой является каскадообразное нарастание генерации продуктов ПОЛ, и в первую очередь супероксидного анион-радикала, с нейтрализацией которых антиоксидантная система организма не справляется.

3.3. Мембранотропное действие змеиных ядов

Электрическая проводимость и ионная избирательность БЛМ липидов тканей при *in vitro* и *in vivo* действии змеиного яда. Обработка исследуемых липидов раствором змеиного яда после отделения их от хлороформ-метанольного растворителя (т.е. всухую) почти не дала никаких изменений электрических свойств по сравнению с БЛМ из необработанных липидов. Инкубация липидов с раствором яда MLO в течение 10 мин при 37°C позволяла получить устойчивые липидные бислои со значением электрического сопротивления порядка 10^{11} Ом, что полностью соответствует стандарту для данных БЛМ из липидов, не подвергнутых обработке ядом. Более того, была замечена тенденция к большей стабилизации БЛМ в электрическом поле, а именно уменьшению величины т.н. “шума”, небольших колебаний измеряемого значения напряжения на мембране, имеющих место в любых БЛМ из гетерогенного набора фосфолипидов. О большей устойчивости БЛМ после обработки липидов ядом говорит также увеличение такого параметра, как потенциал пробоя, подаваемого в виде порогового значения напряжения на мембрану

извне. Если у обычных мембран он колеблется в промежутке 360-400 мВ, то после обработки ядом разрыв мембраны происходит при 480-520мВ.

Далее эксперимент проводился со стандартными липидами (и след. БЛМ), а яд гюрзы добавлялся в среду, омывающую бислой, а именно в 0.1М КСl с двух сторон (таблица 4). В этом случае наблюдается куммулятивный эффект взаимодействия, когда постепенное повышение объема добавляемого яда не приводит к видимому изменению поведения БЛМ в электрическом поле до тех пор, пока он не достигает 0.2 мл по обе стороны мембраны. После чего сопротивление БЛМ резко падает на 3-4 порядка, что свидетельствует об увеличении интегрального значения проводимости ионов через полупроницаемую мембрану. После этого БЛМ может долго выживать в электрическом поле, а значение потенциала пробоя для такой мембраны очень высоко (около 600мВ). Характер изменений проводимости в процессе добавления яда в среду позволяет предположить о поверхностном взаимодействии яда с БЛМ без встраивания его компонентов в бислой, т.е. отсутствует какая-либо каналоподобная активность, наблюдаемая при действии на БЛМ ядов аспидовых, в составе которых есть истинные нейротоксины.

Таблица 4. Влияние *in vitro* ядов змей на электрические свойства БЛМ из липидов головного мозга крысы.

	<i>Vipera lebetina</i>		<i>Montivipera raddei</i>		<i>Naja kaoutia</i>	
	Контроль	Проба	Контроль	Проба	Контроль	Проба
R_m (Ом)	1·10 ¹¹	6·10 ⁸	1.7·10 ¹¹	1.9·10 ⁹	5·10 ¹⁰	3,3· 10 ⁸
g_m (Ом⁻¹)	2·10 ⁻¹¹	3.3·10 ⁻⁹	0.5·10 ⁻¹¹	4·10 ⁻¹⁰	2· 10 ⁻¹¹	3· 10 ⁻⁹
U_p (мВ)	448	270	460	580	450	280

Схожая картина наблюдалась и в случае с ядом армянской гадюки *Montivipera raddei*. Однако, изучение процессов следующих непосредственно после обработки липидов ядом моноклевого кобры выявило принципиальную разницу в механизмах действия исследуемых ядов. Яд *Naja kaoutia* ингибировался с липидами после удаления хлороформ-метанольной среды в течение 10 мин при 40⁰С. Эффект был явным и повлек за собой изменение электрического сопротивления БЛМ более, чем на 3 порядка, что свидетельствует о сильном взаимодействии компонентов яда с липидами мембраны, которое носит характер концентрационной и временной зависимости. В процессе изменения концентрации яда в инкубационной среде (без изменения объема), данная зависимость носит экспоненциальный характер: сопротивление БЛМ постепенно падает по мере увеличения концентрации яда. Изменение же времени инкубации также приводит к падению электрического сопротивления мембран, однако в промежутке от 3 до 5 минут этот переход носит характер резкой ломаной кривой. Интересно также отметить, что малые концентрации яда, при которых не отмечалось изменения параметров БЛМ, приводят к появлению так называемой “каналоподобной” активности с определенной периодичностью, что свидетельствует о наличии в составе яда *Naja kaoutia* компонентов, которые встраиваются в липидный бислой и могут выступать в качестве каналобразующих агентов. Вполне вероятно, что таким компонентом является нейротоксин постсинаптического действия (кобротоксин), который как известно из научной литературы в выделенном виде может образовывать каналы в БЛМ [Doley R., et al., 2004; Wei J-F., et al., 2003].

Интересно было также выяснить, каковы будут свойства БЛМ из липидов тканей после *in vivo* действия ядов. Все три вида ядов привели к изменению электрического сопротивления мембран в сторону более высоких величин по сравнению с контрольной группой, и если в случае гюрзы проводимость мембран уменьшилась примерно в 5 раз, то яды армянской гадюки и моноклевой кобры привели к увеличению сопротивления более, чем в 7 раз. Однако, при этом, мы не всегда вправе говорить о стабилизации мембран, так как такой параметр, как потенциал пробоя, заметно занижен после действия ядов гадюковых и лишь в случае с ядом кобры он выше. Весьма чувствительны изменения свойств БЛМ из сердечной мышцы, электрическое сопротивление которых примерно на порядок выше нормы. Не менее драматичны изменения проводимости БЛМ из липидов печени. Что касается свойств липидов мышечной ткани, то изменения проводимости после интоксикации ядами *Montivipera raddei*, *Naja kaoutia* более явны, чем в случае яда гюрзы. Создается впечатление, что по некоторым параметрам яд армянской гадюки более схож с ядом кобры, чем гюрзы.

Изменение пластических свойств мембран гигантских липосом при действии змеиного яда (1/3 ratio, GP values, I/I' ratio). Интенсивность отрицательно заряженного АНС обратно пропорциональна величине мембранного потенциала. Пик спектра свечения свободного АНС в растворе приходится на 518 нм, почти такое же свечение наблюдается в растворе с ядами гюрзы и армянской гадюки с незначительным сдвигом к 524нм. При наличии в среде гигантских липосом, как модифицированных ядом, так и без, качественных изменений спектра не наблюдается, однако при наличии пика в районе 524нм, наблюдается повышение интенсивности свечения почти вдвое. В то же время суммарное свечение взвеси везикул, модифицированных ядом ниже, чем в контрольной группе (Таблица 5), что может быть обусловлено повреждением упаковки липидного бислоя, которое и приводит в конечном итоге к повышению мембранного потенциала.

Таблица 5. Интенсивность флуоресценции АНС и пирена в гигантских униламеллярных везикулах из общих фосфолипидов мозга до и после инкубации с ядом гюрзы.

Проба	ИНТЕНСИВНОСТЬ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПИРЕНА (ТЕКУЧЕСТЬ МЕМБРАН)			ИНТЕНСИВНОСТЬ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ АНС ($\lambda=524\text{nm}$)
	белок- липидные контакты, I ($\lambda=394\text{nm}$)	Липидный бислой, I' ($\lambda'=457\text{nm}$)	3/1 соотношение пиков	
GUV из липидов (контроль)	160.7	160.7	1.09	251.1
GUV из липидов (с добавлением яда)	110.8	289.8	0.95	216.6

В отличие от АНС, пирен – строго гидрофобен и встраивается полностью в область фосфолипидных хвостов, позволяя определить относительную текучесть и микровязкость бислоя. Будучи совершенно нерастворимым в воде, пирен в буферном растворе практически не дает свечения. Однако, после инкубации с липосомами, флуоресценция резко возрастает (Рис. 9). Собственное свечение змеиного яда в растворе проявляется в

полосе спектра 374нм, что вполне совпадает с общепринятым стандартом для любых белковых растворов. Резкие изменения, как качественные, так и количественные наблюдаются при наличии липидных везикул. Классическим видом спектра флуоресценции пирена в гидрофобной среде является кривая с двумя значительными пиками с максимумами 360нм (пик I) и 394 (пик III), и несколькими характерными мелкими пиками в отмеченном промежутке. Когда же имеет место взаимодействие с липосомами, модифицированными ядом, развертка спектра флуоресценции приобретает следующий вид: во-первых, виден пик в области свечения пептида, идентичный спектру свечения яда в свободном растворе, хотя и в два раза слабее по интенсивности; во-вторых, проявляется характерный «двухголовый» спектр пирена; и, наконец, возникает совершенно новый пик.

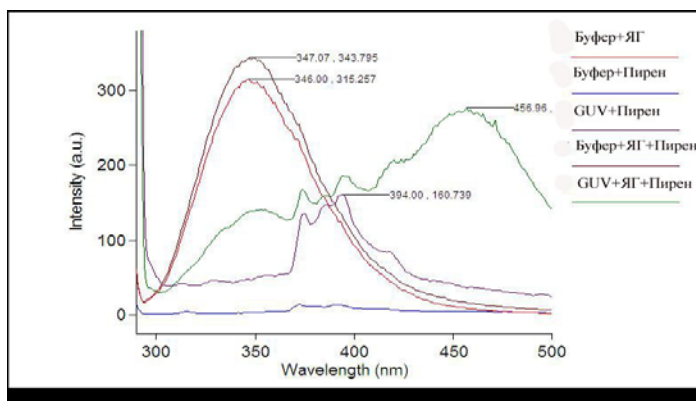


Рис. 9. Спектры флуоресценции пирена при взаимодействии с мембраной липосом, модифицированных ядом гюрзы.

Одинарная молекула пирена в бислойных мембранах дает спектр с двухголовой формой и отношение интенсивности пика III к пику I является характерным параметром для выявления свойств микроокружения флуоресцирующего мономера пирена [Калаянасандарам и Томас, 1977]. В нашем случае соотношение данных пиков выше для GUV-ов без яда ($3/1$ относительно = 1.09), что указывает на меньшее проникновение воды в липидный бислой по сравнению с GUV-ами модифицированными ядом ($3/1$ относительно = 0.95). Кроме того появление нового пика в спектре около 457нм отражает способность пирена к эксимеризации в толще липидных хвостов в зависимости от текучести бислоя, которая изменяется после взаимодействия мембраны с компонентами яда. Соотношение интенсивности свечения эксимеров (I' при $\lambda = 457$ нм) к интенсивности свечения мономеров (I при $\lambda = 394$ нм) встроенного пирена является параметром текучести мембраны (микровязкости), а также его магнитуды встраивания [Нанди и соав., 1983]. При постоянной температуре параметр I'/I прямо пропорционален эффективной концентрации зонда проникшего в мембрану ($I'/I = 2.61$, Таблица 10). Таким образом указанные данные позволяют предположить, что взаимодействие и внедрение белковых компонентов яда в поверхность мембраны может привести к формированию твердой липидной фазы в соответствующих участках липосом. В противовес этому, текучесть бислойных доменов

липидов, не связанных с протеинами в жидко-кристаллической фазе значительно возрастает.

Очень интересен анализ всех приведенных параметров для липосом, сформированных из очищенных протеолипидов мозга. В процессе очистки, данные фракции обогащаются фосфатидилсерином и дифосфоглицерином, в результате чего липосомы из этих фракций наделены сильным отрицательным зарядом. В силу описанных особенностей гигантских липосом из ОПЛ мозга, применение АНС в качестве флуоресцентного зонда, оказалось практически неинформативным, т.к. отрицательный заряд самого зонда не позволяет ему связываться с липосомой, которая в данном случае также несет суммарный отрицательный заряд. Однако те же причины, наоборот, легко позволяют пирену встраиваться в липидный бислой, который однако, почти не присутствует в свободном виде в данных липосомах, а скорее является жестко структурированным микроокружением белков в составе протеолипидов. Эксимеризация пирена имеет место в липосомах еще до обработки ядом, а наличие характерных пиков 3 и 1, хоть и прослеживается очень слабо, но вполне явно свидетельствует об очень сильном проникновении воды в бислой (отношение 3/1 намного меньше 1). При этом, если влияние яда на ГУВ из обычных фосфолипидов приводило к интенсификации свечения пирена, что свидетельствовало об увеличении плотности упаковки гидрофобной среды вокруг флуорофора, то в данном случае, идет вымывание пирена из липидного окружения (преимущественно неэксимеризованного) и резкому повышению текучести мембраны ($I' / I = 0,71$ для контрольных ГУВ и $I' / I = 0,80$ после инкубации с ядом, Таблица 6).

Таблица 6. Интенсивность флуоресценции АНС и пирена в гигантских униламеллярных везикулах из очищенных протеолипидов мозга до и после инкубации с ядом гюрзы.

Проба	ИНТЕНСИВНОСТЬ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПИРЕНА (ТЕКУЧЕСТЬ МЕМБРАН)			ИНТЕНСИВНОСТЬ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ АНС ($\lambda=524\text{nm}$)
	белок-липидные контакты, I ($\lambda=394\text{nm}$)	Липидный бислой, I' ($\lambda'=457\text{nm}$)		
ГУВ из ОПЛ (контроль)	260.9	184.		11.37
ГУВ из ОПЛ (с добавлением яда)	107.4	85.5	2	12.3

Топология связывания дезинтегринов с мембранным субстратом. Следующая серия экспериментов представляет особый интерес, так как является апробацией новейшего экспериментального метода исследования белок-липидных взаимоотношений и их связывания посредством поверхностных акустических волн. Мы использовали гигантские везикулы в качестве негативного контроля против теней эритроцитов, так как исследовалась кинетика связывания дезинтегринов змеиного яда с биологическим субстратом. Как известно, дезинтегрины крайне специфичны при выборе субстрата и могут связываться только с интегринами клеточных мембран. Было использовано два типа дезинтегринов: обтустатин, который, являясь уникальным компонентом яда закавказского подвида гюрзы, представляет особый интерес для наших исследований; и эхистатин из яда *Echis carinatus*, который является вторым по величине коротким дезинтегрином из ныне

известных (самый короткий - обтустатин). Эти два дезинтегрин при минимальных различиях в аминокислотных последовательностях, имеют различные активные сайты связывания с интегринами, и могут соответственно взаимодействовать с разными клеточными рецепторами.

Echistatin(P17347)-ECESGPCCRNCKFLKEGTICKR-ARGD-DMDDYCNGKTCDCPRNPHKGPAT
Obtustatin (P83469)--CTTGPCCRQCKLKPAAGTTCW---KTS--LTSHYCTGKSCDCPLYPG-----

В составе эхистатина 49 аминокислотных последовательностей, четыре дисульфидных мостика между 2 - 11, 7 - 32, 8 - 37, 20 - 39 парами цистеиновых остатков, и последовательность аргинин-глицин-аспартат (RGD) в активном центре связывания. Эта последовательность считается наиболее «классической» в составе дезинтегринов и встречается наиболее часто. Эхистатин может необратимо связываться с $\alpha_v\beta_3$ интегрином, блокируя агрегацию лейкоцитов. Обтустатин состоит из 41 аминокислотных остатков и четырех пар дисульфидных сшивок в позиции 1 - 10, 6 - 29, 7 - 34, 19 - 36 и является высокоспецифичным блокатором $\alpha 1\beta 1$ интегрин коллагена IV ($IC_{50} = 0.8 \text{ nM}$). Но что более важно, активный центр связывания с клеточными рецепторами у обтустатина состоит из последовательности лизин-треонин-серин.

Следующую серию проводили при иммобилизованных на поверхности биосенсора субстратах (ГУВ-ы и тени эритроцитов), а дезинтегрины омывали их поверхность в мобильной фазе (рис.15). Имело место довольно очевидное связывание дезинтегринов с субстратом, которое позволило измерить кинетические данные процесса в режиме реального времени (k_{on} , k_{off} , K_D). При этом константа равновесия диссоциации K_D обтустатина лежит в наномолярной области значений, а эхистатина - в микромолярной. Количественно это означает, что обтустатин связывается с мембраной в концентрации на порядок выше, чем эхистатин.

Таблица 7. Кинетические данные связывания эритроцитарных теней с дезинтегриннами

	Обтустатин	Эхистатин
k_{on}	$5.34 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$4.22 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
k_{off}	$1.238 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$8.85 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
K_D	$0.48 - 2.32 \cdot 10^{-7} \text{ M}$	$2.1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

Для данного типа взаимоотношений лиганд-субстрат имеет место 1:1 модель связывания, которое описывается уравнением Скэтчарда в виде соотношения концентрации свободного и связанного лиганда (Таблица 7). График этого уравнения в координатах k (1/s) на концентрацию (в наномолях) представляет собой прямую, где тангенс угла наклона соответствует K_D – константе сродства лиганда к рецептору (рис 16). Для сравнения следует вспомнить, что константы сродства гормон-рецепторных комплексов лежат в интервале $10^8 - 10^{11} \text{ M}^{-1}$, и это намного больше сродства фермент-субстратных комплексов [Рубин, 1999].

Таким образом, полученные нами данные позволяют судить о наличии в мембране теней эритроцитов интегринов как $\alpha 1\beta 1$, так и $\alpha_v\beta_3$ типов, причем концентрация последних более чем на порядок ниже, чем для коллагенового рецептора. Уже сам факт свидетельства наличия интегринов в мембране эритроцитов, является очень важным результатом, так как таких сведений до сих пор в научной литературе не встречалось. Хотя, после разложения

белковых составляющих мембраны эритроцитов стало ясно, что мнение о том, что в красных кровяных клетках из белков присутствует только гемоглобин и несколько АТФ-азных систем, устарело; тем не менее более подробная идентификация 340 пептидов, обнаруженных в мембранах эритроцитов, все еще не проведена [Pisini E., et al., 2006].

Следует отметить удобство использования метода поверхностных акустических волн для экспериментов по определению кинетики субстрат-лигандного связывания и кинетических показателей аффинности. По указанным данным метод хорошо коррелирует с результатами методов проточной цитометрии и поверхностного плазмонного резонанса по чувствительности (0.5 пг/мм^2), и при этом лишен ограничений, которые часто налагает последний для скрининга малых молекул [Schleizinger M., et al., 2004; 2009].

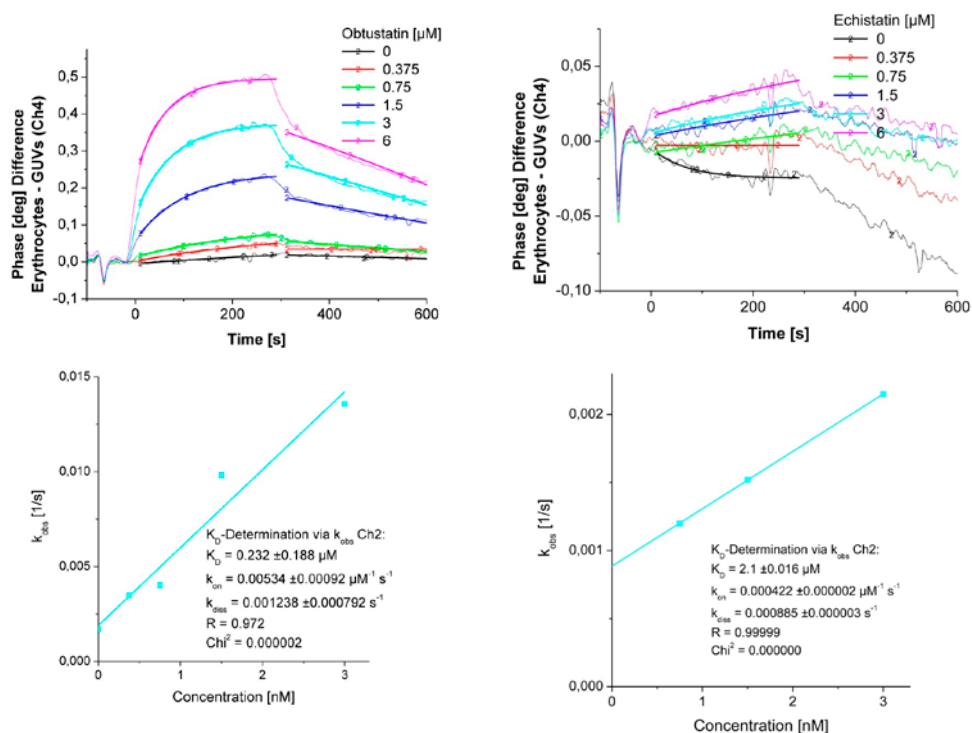


Рис. 10. Взаимодействие обтустатина и эхистатина с теньями эритроцитов против неспецифического связывания с везикулами (негативный контроль, верхний рисунок). Определение кинетических параметров связывания по модели 1:1, характерной для лиганд-рецепторного типа взаимодействий (внизу).

3.4. Визуализация морфологических изменений гигантских липосом под действием змеенных ядов

Морфологические изменения гигантских липосом при добавлении яда в режиме реального времени. Для прямого исследования морфологии липосом под действием ядов GUV-ы были визуализированы при помощи мембранного флуорофора АНС в ходе их гидролиза. АНС связывается с поверхностью мембраны и излучает достаточно интенсивно, чтобы следить за изменениями произведенными на GUV после добавления яда под микроскопом. Имеет место ошутимое увеличение размеров липосом при их модификации низкими концентрациями яда гюрзы при 21 °С в растворе. Более высокая концентрация яда приводит к очень быстрому увеличению интенсивности флуоресценции, после чего везикула полностью растворяется.

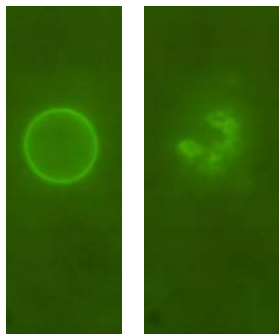


Рис. 11. Действие цельного яда Армянской гадюки на морфологию гигантских униламеллярных везикул. (1.1 мкл раствора яда *Macrovipera lebetina obtusa* в концентрации $3 \cdot 10^{-5} \text{M}$ в Трис- HCl буфере (pH 7.4) добавляли к пробе под микроскопом).

Схожая картина наблюдается также при действии ядом армянской гадюки (рис. 11). Очевидно компоненты яда, взаимодействуя с мембранным бислоем, повреждают упаковку липидного бислоя, который приводит к проникновению воды во внутренний объем везикулы, а следовательно к ее набуханию. При более высоких концентрациях, наличие множественных дефектов приводит к быстрому лизису мембраны, в результате чего флуоресцирующее изображение липосомы исчезает, т.к. АНС, растворяясь в среде, резко теряет интенсивность свечения.

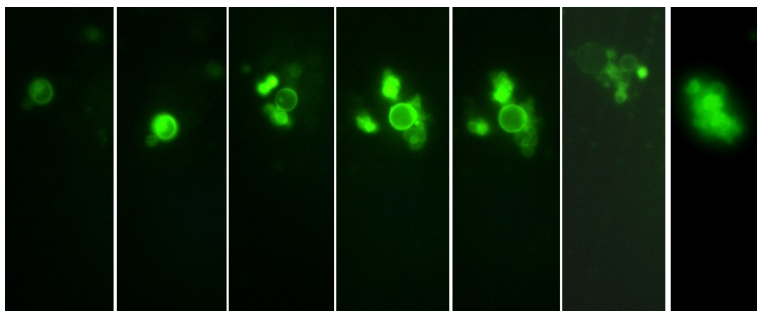


Рис. 12. Действие цельного яда гюрзы на морфологию гигантских униламеллярных везикул, сформированных в среде с содержанием 1.1 мкл раствора яда *Macrovipera lebetina obtusa* в концентрации $3 \cdot 10^{-5} \text{M}$ в Трис- HCl буфере (pH 7.4).

Морфологические изменения гигантских липосом при их формировании в среде с различной концентрацией яда. В практике исследований липид-белковых взаимодействий посредством липосом исключительно важна их способность включать в себя вещества самой различной природы. И компоненты яда также не являются исключением. В следующей серии экспериментов GUV модифицировали ядом гюрзы и армянской гадюки в процессе формирования липосом. Это было сделано для того, чтобы подтвердить встраивание компонентов яда в мембрану и исследовать свойства и морфологические характеристики GUV с поврежденными липидами. Рис. 12 показывает временную развертку выживания липосом, сформированных в среде низкой концентрации яда гюрзы (при 21 °C в растворе). Как видно из рисунка липосомы агрегируют и сливаются в течение приблизительно 15-20 минут, затем исчезают. Интересно, что при той же схеме эксперимента с ядом армянской гадюки, при низких концентрациях везикулы получались овально деформированными (рис. 13, слева), а при наличии скоплений липосом, они легко агрегировались в пенообразные структуры (рис. 13, справа).

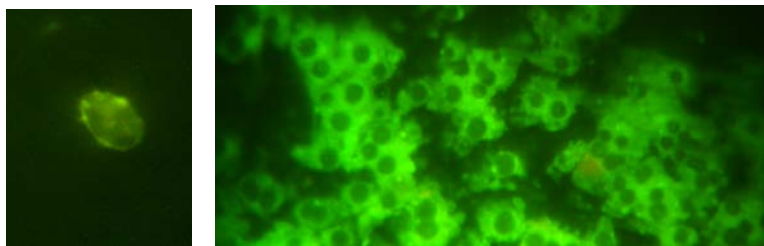


Рис. 13. Действие цельного яда Армянской гадюки на морфологию гигантских униламеллярных везикул, сформированных в среде с содержанием 1.1 мкл (слева) и 2.2 мкл (справа) раствора яда *Macrovipera lebetina obtusa* в концентрации $3 \cdot 10^{-5}$ М в Трис-HCl буфере (pH 7.4).

Такое поведение липидного бислоя после модификации компонентами яда можно объяснить образованием липидных рафтов. Как известно структура рафтов представляется как асимметричный бислой, в котором сфинголипиды локализованы в эктоплазматическом слое, а глицерофосфолипиды (типа фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина) локализованы во внутреннем, цитоплазматическом слое, холестерол присутствует в обоих. Переход из жидкого состояния в твердое сопровождается значительным сокращением площади поверхности. Из этого, в частности, следует, что если в одном монослое индуцируется твердое состояние, а другой остается неизменным, то возникает напряжение, приводящее к изгибной деформации бислоя он становится вогнутым в сторону отвердевшего монослоя. Такое состояние напряжено, и мембрана со временем может переходить в менее напряженное плоское состояние, если трансмембранные белки не препятствуют скольжению монослоев друг относительно друга. В этом примере формообразующая роль фазового перехода очевидна. Такой механизм формирования изгибов может играть важную роль, например, в формировании промежуточных состояний в процессе слияния мембран и их дальнейшей агрегации.

Морфологические изменения гигантских липосом при обработке ядом с подавленной ионами Ba^{2+} фосфолипазной активностью. Для более тонкого анализа топологии белок-липидных взаимодействий при действии яда на гигантские везикулы, мы сочли интересным для начала конкретизировать роль именно фосфолипазы A2 в наблюдаемых эффектах. Для этого, на наш взгляд, существует два экспериментальных подхода: в одном случае следует выделить данный компонент и изучить его конкретное влияние на поведение и морфологию ГУВ, и это классический путь токсинологических исследований. Однако, не менее информативным может оказаться и обратный подход, который мы разработали для достижения поставленной цели: а именно, изучение действия цельного яда при “выключенной”, если можно так выразиться, активности исследуемого компонента.

Для данного оригинального исследования мы инкубировали яды гюрзы и армянской гадюки с ионами Ba, которые являются известными конкурентными ингибиторами Ca-зависимой фосфолипазы A2 из ядов змей [Bagatolli, 2004]. Добавление такого яда гюрзы с подавленной фосфолипазной активностью в режиме реального времени, позволило проследить за образованием т.н. треугольной деформации липосом (Рис. 14). Действие же яда армянской гадюки с ингибированной фосфолипазой, привело к образованию олиговезикулярных липосом, когда внутри большой липосомы отпочковываются мелкие везикулы, а целостность мембраны внешней гигантской везикулы при этом не нарушается (Рис. 15).

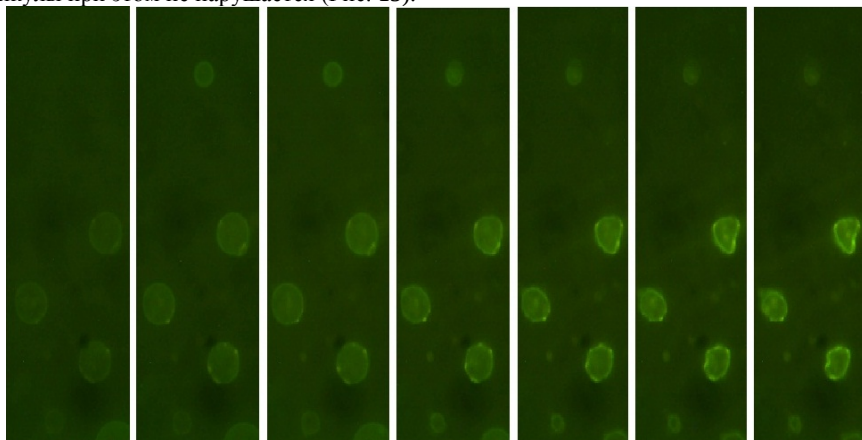


Рис. 14. Действие яда гюрзы с ингибированной фосфолипазой A2 на морфологию гигантских унिलамеллярных везикул (временной период – 5 мин).

Яд *Macrovipera lebetina obtusa* растворяли в Трис- HCl буфере (pH 7.4) для получения конечной концентрации $3 \cdot 10^{-5} M$, инкубировали с $BaCl_2$ (0.1 M) и 1.1 мкл данного раствора добавляли к пробе под микроскопом.

Интересно отметить тот факт, что весь процесс образования ОВЛ легко визуализируется посредством АНС, а следовательно, он сопровождается образованием больших мембранных пор и изменением заряда, т.к. в обычных условиях проникновение отрицательно заряженного гидрофильного зонда внутрь липосомы сильно затруднено, и практически наблюдается только непосредственно перед лизисом везикулы. Уже сам факт

того, что действие ядов, которые по составу не очень сильно отличаются друг от друга, вызывает различные морфологические изменения липосом, позволяет предположить, что мы имеем дело с различными изоформами фосфолипазы A₂, которая, как известно, при даже незначительных изменениях аминокислотного состава, может лишиться энзиматической активности, приобретая при этом, новые свойства, подчас весьма фатальные в своих фармакологических проявлениях.

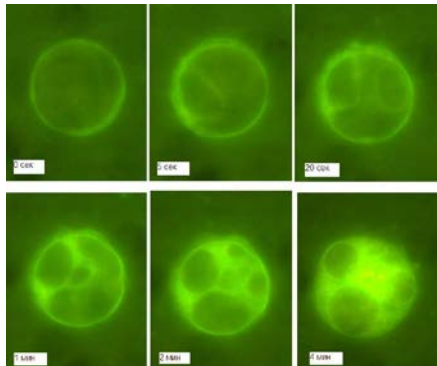


Рис. 15. Образование олиговезикулярных липосом под действием яда гюрзы с ингибированной фосфолипазой A₂ (временной период – 5 мин).

Яд *Macrovipera lebetina obtusa* растворяли в Трис- HCl буфере (pH 7.4) для получения конечной концентрации $3 \cdot 10^{-5}$ М, инкубировали с BaCl₂ (0.1 М) и 1.1 мкл данного раствора добавляли к пробе под микроскопом.

Сравнительный анализ мембранотропных свойств фосфолипаз K49, S49 и D49.

Фосфолипазы A₂ змеяных ядов являются одними из наиболее агрессивных токсических белков, часто играя основную роль в иммобилизации и умерщвлении жертвы. В яде одной и той же змеи фермент может быть представлен несколькими изоэнзимами, фармакологическое действие которых может существенно различаться. Большинство пресинаптических токсинов и миотоксинов змеяных ядов по своей природе являются либо PLA₂, либо содержат в своем составе PLA₂-подобную субъединицу. PLA₂ состоят из 120-125 аминокислотных остатков и содержат 7 дисульфидных мостиков. Установлено, что остаток аспарагиновой кислоты в положении 49 аминокислотной последовательности PLA₂ играет крайне важную роль в процессе катализа и является консервативным в структуре большинства PLA₂ из яда змей. Это – так называемые D49 ферменты. И все же у некоторых PLA₂ из яда гадюковых змей данный аминокислотный остаток замещен остатками лизина, серина, аспарагина или аргинина, а соответствующие PLA₂ классифицируются как K49, S49, N49 и R49 токсины. Они не способны более связывать ионы Ca²⁺, в результате чего теряют липолитическую активность [Angulo Y., et al., 2005], приобретая при этом другие, иногда весьма необычные цитотоксические свойства [Lomonte B. & Rangel J., 2012]. Для характеристики последних мы провели исследование влияния D49, K49 и S49 PLA₂ на гигантские бислойные везикулы (GUVs) с использованием метода флуоресцентной микроскопии.

Действие индивидуальной выделенной из яда гюрзы фосфолипазы VL-PLA2 (D49) вызывает деформацию липосом, которая выражается в том, что сферические липосомы вытягиваются в овал (“овальная” деформация, Рис. 16). Весьма интересным оказалось воздействие на морфологию GUVs PLA₂ K-49 *Bothrops jararacussu* и S-49 *Vipera ursinii renardi*. Визуализация их действия на GUVs выявляет заметное увеличение флуоресценции на мембране везикул, при этом форма и размеры GUVs практически не изменяются. (Рис. 17). Это является существенным различием в действии D49 PLA₂ с одной стороны и K-49 и

S-49 PLA₂ с другой. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что K-49 PLA₂ существуют в виде нековалентных гомодимеров. Такая димерная форма, по-видимому, необходима для проявления ими биологической активности [Gutierrez J-M., et al., 2005; Lomonte B., et al., 2003]. В то же время большинство D49 PLA₂ являются мономерными. К настоящему времени обнаружена только одна D49 PLA₂ тримукротоксин [Tsai I., et al., 1995], существующая в виде нековалентных гомодимеров. Вероятно, этим и объясняются обнаруженные нами различия в действии D49, K-49 и S-49 PLA₂ на GUVs.

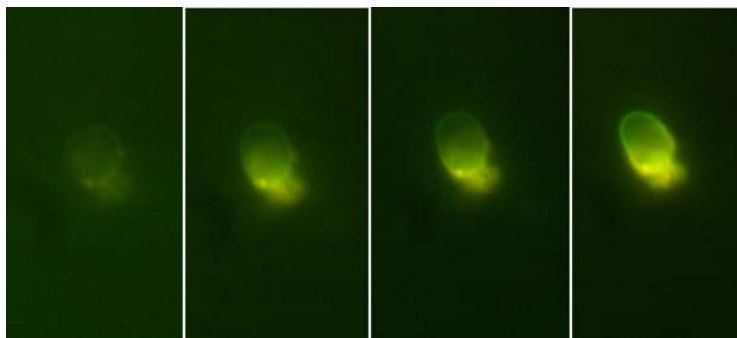


Рис. 16. Действие фосфолипазы VL-PLA₂ на морфологию гигантских униламеллярных везикул. (Конечная концентрация VL-PLA₂ - $3 \cdot 10^{-5}$ М в Трис- HCl буфере (pH 7.4).

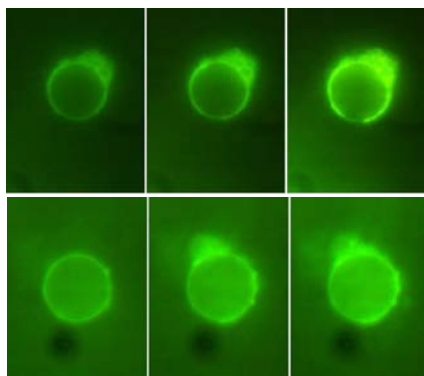


Рис. 17. Действие фосфолипаз K-49 (вверху) и S-49 (внизу) на морфологию гигантских униламеллярных везикул. Конечная концентрация K-49/S-49 - $3 \cdot 10^{-5}$ М в Трис- HCl буфере (pH 7.4).

Далее проводились эксперименты с целью выявления возможного синергизма действия ферментативно активных и неактивных форм фосфолипазы A₂, о котором докладывалось ранее в ряде работ [Fernandez J., et al., 2013; Lomonte B., et al., 1989-2012]. В пользу данного наблюдения говорит и тот факт, что в ядах змей, содержащих атипичную фосфолипазу, как правило обнаруживается, хоть и в небольших количествах, также и номинальная изоформа (D49) фермента [Gutierrez J-M., et al., 2013]. Для данной серии экспериментов фосфолипаза D49 добавлялась вместе с токсином S-49 в среду содержащую ионы Ca²⁺. При этом конечная концентрация фосфолипазы в среде оставалась неизменной, как и для предыдущей схемы эксперимента. Результат оказался более, чем

удивительным: совместное действие двух фосфолипаз (энзиматически активной и без ферментативной активности) повлекло резкое сокращение размера липосом уже на 20-й секунде (рис. 18). Такая реакция до сих пор наблюдалась только при воздействии больших концентраций цельного яда. Таким образом, с уверенностью можно утверждать, что наличие разных изоформ фосфолипазы A_2 в ядах большинства гадюковых, призваны усиливать фармакологическое действие каждого из них, и данная находка в эволюции ядов наглядно показывает, как минимальные изменения структуры позволяют достичь несоразмерно существенных изменений функции и свойств.

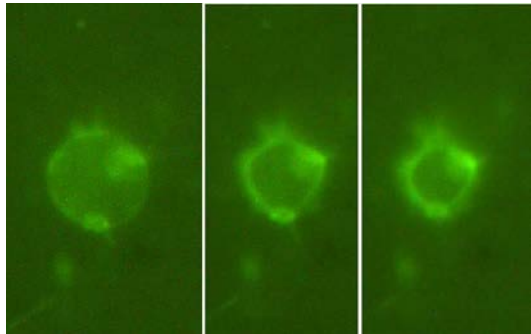


Рис. 18. Совместное действие фосфолипаз D-49 и S-49 на морфологию гигантских униламеллярных везикул. Конечная концентрация D-49+S-49 - $3 \cdot 10^{-5} \text{M}$ в Трис- HCl буфере (pH 7.4).

Далее целью наших исследований было проверить при помощи двух производных нафталена насколько глубокие изменения в липидном бислое влечет за собой взаимодействие липосом с указанными изоформами фосфолипазы A_2 . Как уже отмечалось в методической части флуоресцентные зонды LAURDAN и PRODAN являются удобными маркерами для сравнительного анализа жесткости липидной упаковки в бислое и степени проникновения водного раствора в бислой. Данные зонды различаются по своей степени погруженности в липидный бислой: LAURDAN являясь полностью гидрофобным зондом прочно связывается своим лауриловым отростком с гидрокарбоновыми хвостами липидов, оказываясь почти полностью в бислое; PRODAN со своим более коротким пропионоловым отростком является частично водорастворимым и более слабо взаимодействует с гидрофобной частью липидов и может показывать свечение также и в водной среде при 515нм. По сравнению с LAURDAN-ом PRODAN локализуется ближе к гидратированной поверхности бислоя в более полярной среде и способен реагировать на свободную ротацию водных диполей.

Функция генеральной поляризации (GP) данных зондов позволяет судить о степени проникновения раствора в бислой и дипольной релаксации микроокружения. Результат расчетов значений GP для обоих зондов представлен на рисунке 19. Сразу же бросается в глаза довольно глубокое расхождение значений генеральной поляризации липосом обработанных ядом и фосфолипазами с контрольными ГУВ. Второе наблюдение, которое также можно отметить как наиболее очевидное, это то, что среди фосфолипаз наименьший эффект на состояние мембраны оказывает K-49, который в случае более гидрофобного LAURDAN-а действует на мембрану слабее, чем даже цельный яд гюрзы. Надо отметить, что теоретически значение GP функции должно лежать в пределах -1.0 - +1.0; однако в практике реальный разброс значений может находиться в пределах -0.3 – 0.6, причем как для отдельных липидов, так и для миксов. Более детально можно сказать,

что в зависимости от набора липидов и температуры, значение GP для жидкой фазы находится в пределах от -0.3 до 0.3, а для гелевого состояния липидов – в районе 0.5 – 0.6.

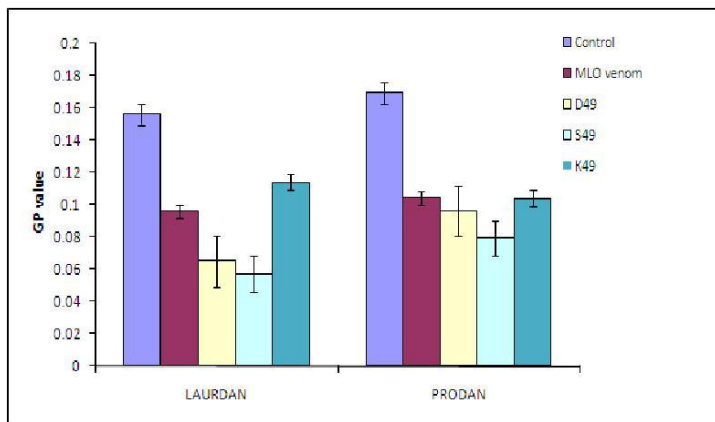


Рис. 19. Изменение значений функции генеральной поляризации (GP) флуоресцентных зондов LAURDAN и PRODAN в мембранах гигантских униламеллярных везикул при воздействии ядом гюрзы и различных изоформ фосфолипазы A₂.

Как видно из наших результатов, практически все значения GP наших липосом, включая контрольные, попадают в область средней текучести, что считается нормой для везикул из природного набора фосфолипидов. Однако довольно сильное падение значений поляризации обоих зондов для обработанных липосом, говорит о довольно значительном нарушении упаковки липидов в бислое. Причем данное нарушение касается не столько изменений в упаковке полярных головок липидов, сколько плотности упаковки гидрофобных жирнокислотных хвостов и проникновения в них воды. Для наших объектов исследования наибольшее влияние на микровязкость жирнокислотных хвостов в мембране оказывает токсин S-49, несколько слабее действие D-49, действие же димерного токсина K-49, как уже отмечалось наиболее слабое: слабее, чем эффект цельного яда.

3.5. Исследование сравнительной токсичности яда гюрзы и армянской гадюки против активности существующей сыворотки

In vivo нейтрализация. Данные нашей серии экспериментов по оценке значений ЛД50 и МНД, рассчитанных и для мышей, и для крыс, соответственно, суммированы в **Таблице 8** в сравнении с соответствующими показателями для носатой гадюки VAA. Как видно из таблицы, яд MR проявляет токсичность сравнимую с таковой VAA и наиболее выраженный геморрагический эффект. Яд MLO - наиболее слабый из приведенных ядов по измеряемым показателям, что хорошо коррелирует с полученными ранее данными по токсичности гадюк Армянского нагорья.

Потенциал Загребского противоядия нейтрализовать геморрагичность ядов MLO и MR (50 мкг) тестировался на крысах. Вполне ожидаемо эффект сыворотки наилучшим

образом проявился в случае VAA, однако она определенно, хоть и слабее, действует против ядов двух других исследуемых гадюк (Рис 20).

Таблица 8. Летальная токсичность (LD_{50} в мкг) и геморрагический потенциал (MHD в мкг) ядов VAA, MR и MLO.

	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	<i>Montivipera raddei</i>	<i>Macrovipera lebetina obtusa</i>
LD_{50} [μg]	4.4 ± 13.7*	9.1 ± 0.5	18.4 ± 1.4
MHD [μg]	21.6 ± 42.8*	6.0 ± 0.4	29.7 ± 0.4

- Зависит от географического ареала (как показано Halassy et al. (2011)).

А именно, если полная нейтрализация геморрагического поражения ядом VAA наступала после обработки 2.5мл сыворотки, то такой же эффект против аналогичных доз ядов MLO и MR достигался только при обработке десятикратно большей концентрацией противоядия – 25мл. В дополнение, важно отметить интересный факт, что при тестировке нейтрализации геморрагичности яда MR в больших дозах (50мкг или 9 MHD), проявлялось наличие двух колец повреждения на подкожной поверхности: меньшее по диаметру, но с резко очерченными краями, и большего наружного слабо выраженного кольца (Рис. 20). При этом сыворотка явно лучше нейтрализовала внутреннее кольцо геморрагического поражения, и намного слабее – внешнее, что позволяет предположить наличие в яде Армянской гадюки небольшого количества белка с геморрагической активностью, которого нет в составе яда двух других исследуемых гадюк. О малом количестве говорит тот факт, что при малых дозах яда, данный эффект не проявляется.

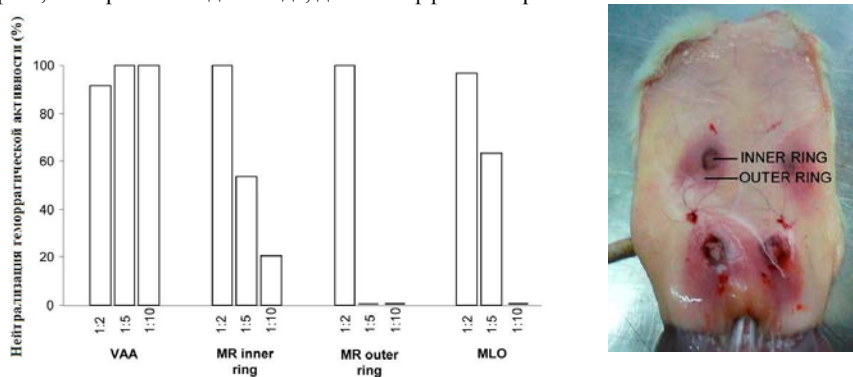


Рис. 20. Нейтрализация геморрагической активности ядов гюрзы (MLO), Армянской гадюки (MR) и носатой гадюки (VAA) Загребской противозмеиной сывороткой.

In vitro нейтрализация. Яды MLO и MR проявляют протеолитическую активность к азоказеину (Рис 21). На рисунке показаны спектрофотометрические графики зависимости поглощения в ходе протеолитической реакции от времени инкубации с ингибиторами. На диаграммах же показан процент торможения реакции в кювете: при этом действие чистого яда прятнялось за 100% выход реакции. Как видно из приведенных данных, так же, как и для яда VAA (Рис. 21, нижний рисунок), Pefabloc (ингибитор сериновых протеаз) ингибирует 40%, а Na_2EDTA (ингибитор Zn -зависимых металлопротеаз) - около 60%

протеолитической активности яда MLO (Рис. 21, верхний). Когда же использовали в качестве протеолитического агента яд MR, Pefabloc совершенно не показывал ингибирующего действия, в то время как, Na_2EDTA и отдельно, и в миксе с Pefabloc полностью снимал энзиматический эффект на азоказеин. Такой результат позволяет предположить, что в случае яда MR только и только металлопротеазы ответственны за азоказеинолитическую активность яда.

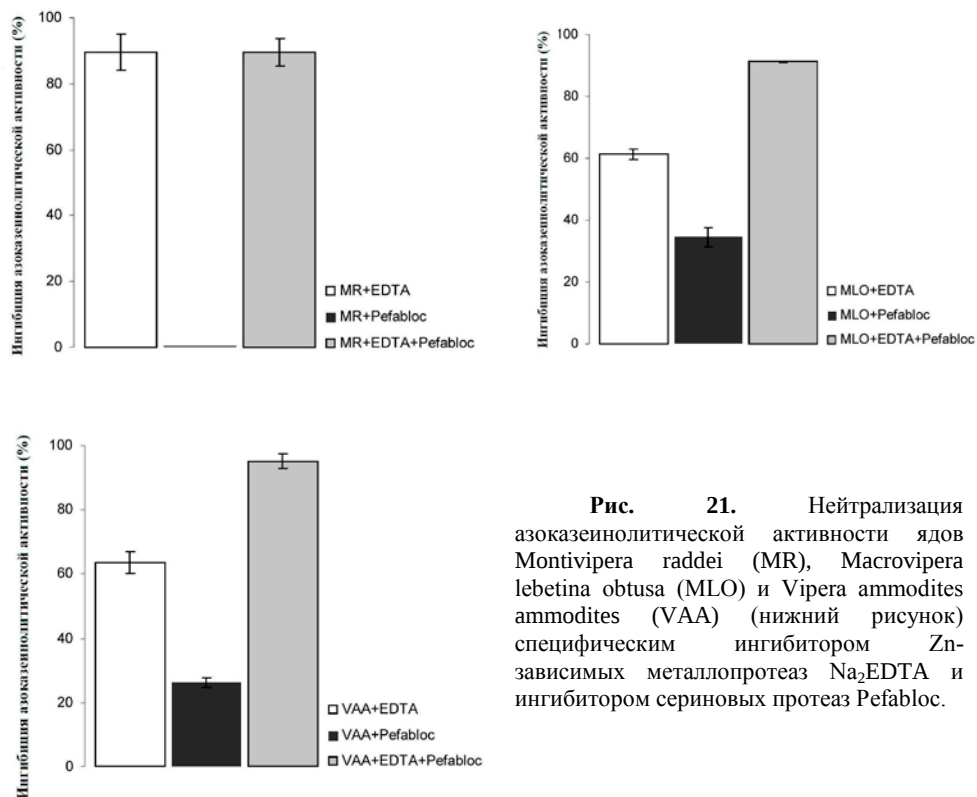


Рис. 21. Нейтрализация азоказеинолитической активности ядов *Montivipera raddei* (MR), *Macrovipera lebetina obtusa* (MLO) и *Vipera ammodytes ammodytes* (VAA) (нижний рисунок) специфическим ингибитором Zn -зависимых металлопротеаз Na_2EDTA и ингибитором сериновых протеаз Pefabloc.

Протеолитическую активность ядов тестировали также α -бензоил-Фен-Вал-Арг-*p*-нитроанилидом (pNA), который является специфичным субстратом сериновых протеаз (Рис. 22). На этот раз тестировали способность вышеуказанных ингибиторов нейтрализовать способность ядов к подавлению активности pNA после их преинкубации с Pefabloc и Na_2EDTA . Согласно данным экспериментов, Pefabloc проявил высокую эффективность в качестве ингибитора амидолиза в случае обоих ядов, тогда как Na_2EDTA в данном случае совершенно не изменил их протеолитическую активность.

Из практических соображений, третью серию *in vitro* экспериментов по иммунореактивности исследуемых ядов провели под действием Загребской противозмеиной сыворотки. Опять же, как и ожидалось, 4-кратно разведенная сыворотка

была наиболее эффективна против протеолитической активности гомологичного яда VAA, полностью блокируя ее азоказеинолитическую активность, тогда как, то же действие ядов MR и MLO, ингибировалось в среднем всего на 10 и 20%, соответственно (Рис. 23).

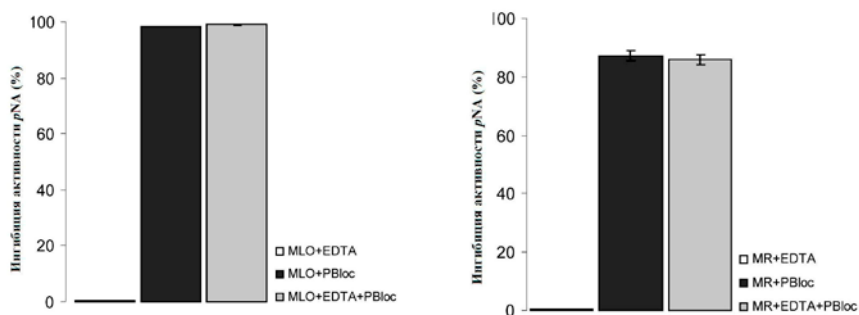


Рис. 22. Ингибция активности $N\alpha$ -бензоил-Фен-Вал-Арг-*p*-нитроанилида ядами *Montivipera raddei* (MR) и *Macrovipera lebetina obtusa* (MLO) и ее нейтрализация специфическим ингибитором Zn-зависимых металлопротеаз Na_2EDTA и ингибитором сериновых протеаз Pefabloc.

Чтобы исключить действие сериновых протеаз, и таким образом, тестировать эффект на действие Zn-зависимых металлопротеаз, еще одна серия экспериментов была проведена с Pefabloc-ингибированным ядом на азоказеин (Рис. 23, справа). Как видно из рисунка и приведенных данных, в описываемых условиях, ингибирующий эффект противозмеиной сыворотки остался неизменным. При том же 4-кратном разведении, сыворотка блокировала азоказеинолитическую функцию Pefabloc-ингибированного яда MLO на те же 20%, однако в случае MR ингибции почти совсем не наблюдалось, поэтому на диаграмме данного яда нет.

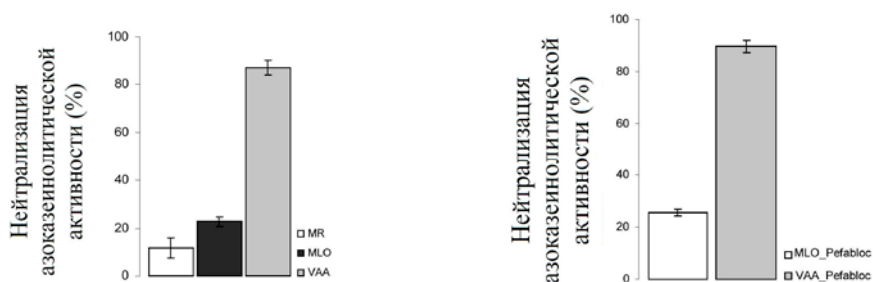


Рис. 23. Нейтрализация азоказеинолитической активности ядов *Montivipera raddei* (MR), *Macrovipera lebetina obtusa* (MLO) и *Vipera ammodytes ammodytes* (VAA) (слева) и ядов, преинкубированных с Pefabloc (справа), Загребской противозмеиной сывороткой.

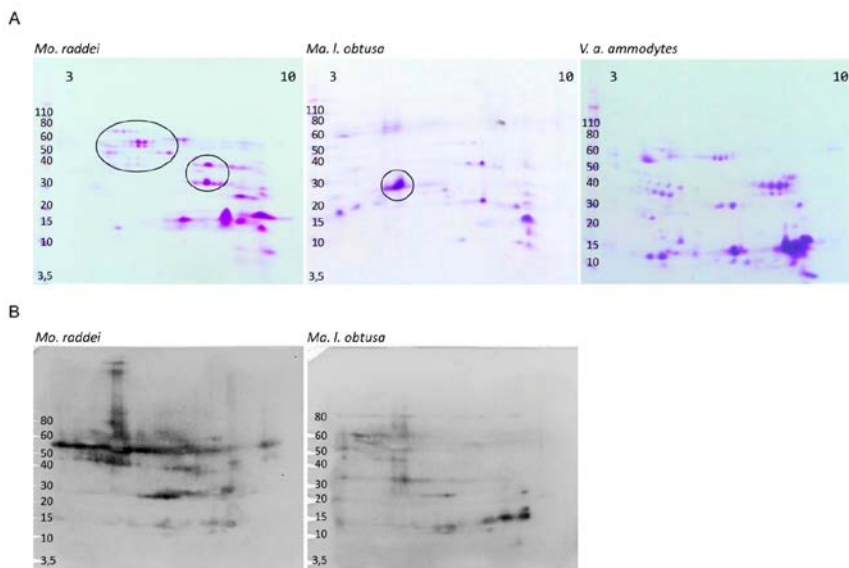


Рис. 24. Анализ гелей двумерного полиакриламидного электрофореза ядов *Montivipera raddei* (MR), *Macrovipera lebetina obtusa* (MLO) и их кросс-реактивность с Загребской противозмеиной сывороткой (по методу Вестерн-блоттинга). Обведенные кружками участки указывают на наиболее явные качественные различия составов исследуемых ядов от протеомикса *Vipera ammodytes ammodytes* (VAA).

Иммунологическое сходство ядов MR и MLO с ядом VAA. Иммунологический профиль ядов исследовался методом фракционирования белков двумерным гель-электрофорезом и их последовательным анализом Вестерн-блоттингом с использованием Загребской противозмеиной сыворотки. Результаты показали, что оба исследуемых яда значительно отличаются по составу от яда носатой гадюки (Рис 24А). Однако, по данным иммуноблоттинга, Загребская противозмеиная сыворотка проявляет сильную кросс-реактивность к компонентам MR-яда, что говорит о высокой степени иммунологического сходства (Рис. 24В) между ядами этих гадюковых. Наиболее очевидно отсутствие иммунного распознавания сывороткой имеет место для 15кДа белковых пятен локализованных в спектре pH от слабо-кислотного до слабо-основного, а также при pI равной 9-10 и молекулярных масс 10 и 60 кДа. В отличие от указанного, распознавание сывороткой компонентов яда MLO проявилось намного слабее. Основная часть белков в районе 15-20кДа показала отсутствие либо очень слабую иммунную реакцию в изоэлектрической точке 3, далее такую же реакцию мы отметили для кислых представителей 25кДа, а также компонентов 20 и 40 кДа в нейтральной и слабо основной области. Остались в числе нераспознанных также компоненты яда MLO в 10, 12.5 и 20 кДа с изоэлектрической точкой в пределах 9-10.

ВЫВОДЫ

1. Впервые установлен полный биохимический состав ядов закавказской гюрзы и армянской гадюки.
2. Яды трех подвидов гюрз: среднеазиатской, средиземноморской и закавказской, сильно различаются по своему протеомному составу (около 4% сходства), что позволяет предложить исследуемый подвид гюрзы как отдельный вид гадюковых.
3. Яды гадюковых имеют антиоксидантные свойства и подавляют генерацию свободных радикалов в тканях и липидных экстрактах высших позвоночных, проявляя при этом так называемая жертва-специфичность.
4. Яды гадюковых заметно изменяют мембранотропные свойства липидов тканей жертвы при интоксикации, что проявляется в липидном рафте и изменении физико-химических параметров искусственных мембран, смоделированных из пораженных тканей.
5. Посредством прямой визуализации гигантских униламмелярных липосом удалось проследить за изменениями пластических свойств бислойных липидных мембран при воздействии ядов и их составляющих в режиме реального времени.
6. В сопоставимых концентрациях различные изоформы фосфолипазы A2 из яда гадюковых оказывают разнонаправленное действие на морфологию гигантских униламмелярных везикул, а также проявляют синергическое усиление эффекта при совместном воздействии.
7. Установлена кинетика связывания короткого дизинтегрина обтустатин из яда закавказской гюрзы с тениями эритроцитов посредством метода поверхностных акустических волн.
8. Впервые изучены геморрагические и протеолитические свойства ядов закавказской гюрзы и армянской гадюки и их иммунологическое сходство с ядом носатой гадюки.
9. Исследование сравнительной токсичности яда гюрзы и армянской гадюки против активности существующей сыворотки показало, что противогадюковая сыворотка производства Загребского института иммунологии в 10 раз слабее нейтрализует яд гюрзы и армянской гадюки по сравнению с ядом европейской носатой гадюки.

Список публикаций по теме диссертации

1. Закарян А.Е., Айвазян Н.М., Карагезян К.Г. Сравнительный анализ активности супероксиддисмутазы в тканях высших позвоночных. *Докл. РАН*, 2002, т.382, N2, с.264-266.
2. Айвазян Н.М., Закарян А. Е., Закарян Н.А. Интенсивность процессов свободнорадикального окисления липидов у некоторых высших позвоночных. *Ученые записки ЕГУ*, 2002, N2, с.92-98.
3. Айвазян Н.М., Закарян А.Е., Карагезян К.Г. Интенсивность процессов свободнорадикального окисления и активность супероксиддисмутазы в нервной ткани позвоночных. *Нейрохимия*, 2002, том 19, N4, с. 284-287.
4. Закарян А.Е., Айвазян Н.М. Ионная проницаемость модельных бислойных мембран из липидов тканей различных позвоночных для одновалентных ионов. *Биофизика*, 2002, т.47 (6), с.1068-1072.

5. Закарян А.Е., Айвазян Н.М., Карагезян К.Г. Физико-химические свойства искусственных бислойных мембран из липидов тканей позвоночных. *Докл. РАН*, 2003, т.388, N1, с.1-3.
6. Закарян А.Е., Айвазян Н.М., Закарян Н.А. Изучение хемилюминесценции мембранных структур тканей позвоночных при воздействии УФ-излучения. *БЖА*, 2003, N1-2 (55), стр.3-7.
7. Закарян А.Е., Элбакян В.Л., Айвазян Н.М., Погосян Г.А., Закарян Н.А., Сеферян Т.Е., Трчунян А.А. Основы метода хемилюминесцентного анализа и программное обеспечение LABVIEW для регистрации и математической обработки данных. Сб. трудов конф. “Образовательные, научные и инженерные приложения в среде LABVIEW и технологии National Instruments”, 17-18 ноября, Москва, 2006, с. 429-432.
8. Sanz L., Ayvazyan N., Calvete J.J. Snake venomomics of the Armenian mountain vipers *Macrovipera lebetina obtusa* and *Vipera raddei*. *Journal of Proteomics*, Vol. 71, Issue 2, 2008, pp. 198-209.
9. Айвазян Н.М., Закарян Н.А., Меграбян Т.А., Закарян А.Е. Действие токсина закавказской гюрзы (*Vipera lebetina obtusa*) на свободно-радикальное окисление липидов нервной ткани позвоночных. *Ученые записки ЕГУ*, 2008, N2, сс. 94-99.
10. Айвазян Н.М. Использование биофизических методов в современной герпетологии. *Современная герпетология*. 2008. Том 8, вып. 1. С. 3 – 9.
11. Закарян А.Е., Айвазян Н.М., Казарян Н.А., Тунян М.Ю. Новые модельные системы индуцированной хемилюминесценции для биомониторинга свободнорадикальных процессов. *Мед. Наука Армении*, 2009, т. XLIX, N1, с. 81-86.
12. Ayvazyan N.M., Zaqarian A.E., Ghazaryan N.A. //Free radical oxidation and condition of membranes from brain lipids of vertebrates in the course of *Vipera Lebetina Obtusa* venom interaction. *New Armenian Medical journal*, 2011, N3, 4-10.
13. Ayvazyan N.M., Ghazaryan N.A., Zaqarian N.A. // Electroporation and electropremeabilization of lipid bilayer membranes in the course of snakes' venom intoxication. *Journal of Biophysical Chemistry*, Vol. 3, No. 1, 2012, pp. 44-48.
14. Ayvazyan N.M., Zaqarian N.A., Ghazaryan N.A., Molecular events associated with *Macrovipera lebetina obtusa* and *Montivipera raddei* venom intoxication and condition of biomembranes. *BBA–Biomembranes*, Vol.1818, N5, 2012, pp. 1359-1364.
15. Ayvazyan N., Ghazaryan N.A., Lipid bilayer condition abnormalities following *Macrovipera lebetina obtusa* snake envenomation. *TOXICON*, Vol. 60, Issue 4, 2012, pp. 607–613.
16. Ghazaryan N.A., Ghulikyan L.A., Ayvazyan N.M., Molecular mechanisms of *Macrovipera lebetina obtusa* venom action on giant unilamellar vesicles from brain proteolipids. Мат. Международной Юбилейной Конференции “Физиологические механизмы регуляции деятельности организма”, 10-13 октября 2012г. Ереван, сс. 117-121.
17. Ghazaryan N.A., Ghulikyan L.A., Ayvazyan N. Morphological changes of proteolipid giant unilamellar vesicles affected by *Macrovipera lebetina obtusa* venom visualized with fluorescence microscope. *Journal of Membrane Biology*, V.246, Issue 8, 2013, pp.627-632.
18. Kurtovic T., Balijs ML, Ayvazyan NM, Halassy B. Paraspecificity of *Vipera a. ammodytes*-specific antivenom towards *Montivipera raddei* and *Macrovipera lebetina obtusa* venoms. *TOXICON*, Vol. 78, February 2014, pp. 103–112.
19. Н. А. Казарян, Л. Гуликян, Б. Ломонте, Т. В. Андреева, В. И. Цетлин, Ю. Н. Уткин, Н. М. Айвазян. Сравнительный анализ мембранотропных свойств различных фосфолипаз a2 из яда змей семейства *viperidae*. *Докл. РАН*, 2014, том 457, № 1, сс. 111–113.

20. N. A. Kazarian, L. Gulikyan, B. Lomonte, T. V. Andreeva, V. I. Tsetlin, Yu. N. Utkin, and N. M. Aivazyan. Comparative Analysis of Membranotropic Properties of Various Phospholipases A₂ from Venom of Snakes of the Family Viperidae. **Doklady Biochemistry and Biophysics**, 2014, том 457, № 1, pp. 111–113.
21. N. A. Ghazaryan, L. Ghulikyan, A. Kishmiryan, T. V. Andreeva, Yu. N. Utkin, V. I. Tsetlin, B. Lomonte and N. M. Aivazyan. Phospholipases a₂ from *Viperidae* snakes: Differences in membranotropic activity between enzymatically active toxin and its inactive isoforms. **BBA–Biomembranes**, Volume 1848, Issue 2, February 2015, Pages 463–468.
22. N.A. Zaqaryan, N.A. Ghazaryan, N.M. Ayyazian. Dynamic changes in lipid peroxidation and antioxidant level in rat's tissues with *Macrovipera lebetina obtusa* and *Montivipera raddei* venom intoxication. **Journal of Biophysical Chemistry**, 2014, vol.5, N4, pp.152-160.
23. Zakharyan A.E., Ayyazian N.M. Modeling of blms in aspect of phylogenetic development of vertebrates. In book: Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes, 2 (Edited by A. Ottova-Leitmannova), Elsevier, 2005, pp.238-259.
24. Айвазян Н.М. Перекисное окисление и мембраны в концепции филогенеза позвоночных. **Lambert Academic Publishing, Гамбург**, 2011, 100с.
25. Закарян А.Е., Айвазян Н.М., Закарян Н.А. Супероксиддисмутаза как антиокислительная защита в концепции филогенетического развития позвоночных. Тез. Докл. IV Межд. конференции “Биоантиоксидант”. Москва, 2002, с.195-196.
26. Закарян А.Е., Айвазян Н.М. Изучение перекисного окисления липидов и активность супероксиддисмутазы в тканях высших позвоночных. Сб. Науч. Трудов ассоциации терапевтов-интернистов РА, 2002, Вып.IV, с.109-111.
27. Ayyazian N.M., Zakharian A.E., Ovakimian M.E. New approaches in studies of *vipera lebetina obtusa* venom action on lipids of nervous tissue of vertebrates. 12th Ordinary General Meeting of Societas Europaea Herpetologica, 12-16 August 2003, St.Petersburg, Russia, pp.32-33.
28. Закарян А.Е., Айвазян Н.М., Овакимян М.Э. Действие змеиного яда на перекисное окисление липидов головного мозга. // Мат. 1 Межд. Конференции “Современные аспекты реабилитации в медицине”, 23-25 сентября 2003г., Ереван, с. 146.
29. Ghazaryan N. A., Ghulikyan L., Kishmiryan A., Ayyazian N.M. Comparative analysis of D49 A₂ and K49 A₂ isolated from *Macrovipers lebetina obtusa* and *Bothrops jararacussu* snake venoms. 8th IUPAP International Conference on Biological Physics. June 18-22, 2014, Beijing, China, p. 95.
30. Ayyazian N.M., Zakharyan A.E. New approaches of lipid bilayer membrane's modeling in toxicological studings. 9th International Summer School of Biophysics “Supramolecular structure and function”, 16-28 Sep, 2006, Rovinj, Croatia, p. 97.
31. Ayyazyan N.M., Zaqaryan N.A. Montivipera raddei venom biochemistry and action on a model membrane's properties. “2nd biology of the vipers conference”, 24-27 Sep, 2007, Porto, Portugal, p. 48.
32. Ayyazyan N.M., Zaqaryan N.A., Zaqaryan A.E. New approach in studies of viper venom's interaction with BLMs and mixed-lipid giant unilamellar vesicles. **FEBS Journal** 276 (Suppl. 1): 33th FEBS Congress & 11th IUBMB Conference, 28 June-3 July 2008, Athens, Greece, v. 280, p. 280.
33. Айвазян Н.М., Закарян Н.А., Закарян Э. А. In vitro и in vivo действие токсина закавказской гюрзы (*Vipera lebetina obtusa*) на свободно-радикальное окисление липидов различных тканей крыс. Мат. вторых чтений, посвященных памяти В. И. Корогодина и В. А. Шевченко, Дубна – Москва, 12-13 января 2009г., с. 58.

34. Ayvazian N.M., Zaqaryan N.A., Ghazaryan N.A. Single Mixed-Lipid GUV Method Reveals Interaction of Viper venom with Lipid Membranes. **FEBS Journal** 276 (Suppl. 1): 34th FEBS Congress, Prague, 4-9 July 2009, p.177.
35. Ayvazyan N.M., Zaqaryan N.A., Ghazaryan N.A. Single Mixed-Lipid GUV Method Reveals Interaction of Viper venom with Lipid Membranes. **European Biophysics Journal**, Supplement 1: 7th EBSA Congress July 11-16 2009, Genoa, Italy, v.38, p.178.
36. Ayvazian N.M., Zaqaryan N.A., Ghazaryan N.A. Ionic Permeability of Mixed-Lipid Giant Unilamellar Vesicles Modified with *Vipera lebetina obtusa* Venom. "Solvation and Ionic Effects in Biomolecular Recognition: Theory to Experiment", May 17-21, 2010, Tsakhkadzor, Armenia, p.51.
37. Ayvazian N.M., Zaqaryan N.A., Ghazaryan N.A. Fluorescence microscopy of the viper venom's interaction with Mixed-Lipid Giant Unilamellar Vesicles from bovine brain. **Journal of Neurochemistry**, Supplement: 4th ISN Special Conference "Membrane domains in CNS Physiology and Pathology", Sicily, Italy, 22-26 May, 2010, v.113, p. 2.
38. Ayvazian N.M., Zaqaryan N.A., Ghazaryan N.A. Chemical engineering of artificial lipid vesicles and bilayer membrane in toxicological studying: theory to experiment. Joint EUROMAR 2010 and 17th ISMAR Conference "WWMR2010", Florence, Italy, 4-9 July, 2010, p.143.
39. N.M. Ayvazian, N.A. Zaqaryan, N.A. Ghazaryan Snake venom and chemical engineering of artificial lipid vesicles and bilayer membranes: theory to experiment. **Toxicon** Special Issue: 17th Congress of the European Section of the International Society on Toxinology. 11-15 Septiembre, Valencia, 2011, p.201.
40. N. M. Ayvazian, N. A. Ghazaryan, L. Ghulikyan Lipid Bilayer Condition Abnormalities Following *Macrovipera lebetina obtusa* and *Montivipera raddei* Snake Envenomation. **Toxicon** Special Issue: 17th World Congress of the International Society on Toxinology & Venom Week 2012, 4th International Scientific Symposium on All Things Venomous, Honolulu, Hawaii, **July 8 - 13, 2012**; Volume 60, Number 2, August 2012, p. 167.
41. N.Ghazaryan, L.Ghulikyan, H.Tadevosyan, G.Kirakosyan, N.Ayvazyan Membrane perturbation of erythrocyte ghosts induced by *Macrovipera lebetina obtusa* venom. **Eur Biophys J** July 2013, Volume 42, Issue 1 Supplement, p 150.
42. N. Ghazaryan, L. Ghulikyan, H. Tadevosyan, G. Kirakosyan, N. Ayvazyan, ANS-containing phospholipid giant unilamellar vesicle deformation under the influence of *MACROVIPERA LEBETINA OBTUSA* venom (PLA₂ inhibited). 3rd Jubilee International Conference of Neuroscience and Biological Psychiatry, Sep. 22-24, 2013, Yerevan, Armenia, pp. 18-20.
43. N. Ghazaryan, L. Ghulikyan, H. Tadevosyan, G. Kirakosyan, N. Ayvazyan, Studies of membrane structure with fluorescent LAURDAN and PRODAN probes in the course of *Macrovipera lebetina obtusa* venom interaction. 3rd Jubilee International Conference of Neuroscience and Biological Psychiatry, Sep. 22-24, 2013, Yerevan, Armenia, pp. 51-53.
44. Yu.N. Utkin, E.A. Vulfius, A.V. Osipov, N.A. Ghazaryan, N.M. Ayvazyan, Multifunctional phospholipases A2 from snake venoms. 3rd Jubilee International Conference of Neuroscience and Biological Psychiatry, Sept. 22-24, 2013, Yerevan, Armenia, pp. 33-35.
45. G. R. Kirakosyan, H.H. Tadevosyan, N.A. Ghazaryan, L.A. Ghulikyan, N.M. Ayvazyan, The effect of *Macrovipera lebetina obtusa* viper venom on erythrocyte ghosts' membrane ATPase activities. **BBA-Bioenergetics**, Volume 1837, Supplement, July 2014, Pages e109–e110.

MACROVIPERA LEBETINA OBTUSA և *MONTIVIPERA RADDEI* ԻԺԵՐԻ ԹՈՒՅՆԻ
ԹԱՂԱՆԹԱԹՐՈՂ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ԿԵՆՍԱՖԻԶԻԿԱԿԱՆ ԱՍՊԵԿՏՆԵՐԸ

Ամփոփագիր

Հանգուցային բառեր՝ դեզինտեգրիններ, էլեկտրապորացիա, թաղանթային մոդելներ, մակերեսային ձայնային ալիքներ, քիմյունմինեացնատում, ֆլուորեսցենսային զոնդեր, K49, *Macrovipera lebetina obtusa*, *Montivipera vaddei*, PLA₂:

Հայաստանի Viperid-ների թույնի հետազոտումը ներառում է բաղադրիչների անալիզը, կառուցվածքի եւ ազդեցության ուղիների հետազոտումը, ներառյալ կենսաքիմիական, դեղագործական և իմունաբանական ասպեկտները և մոլեկուլային կենսաբանությունը, նյարդային համակարգի ռեցեպտորների ուսումնասիրումը, թույնի բաղադրիչների նույնացումը, որոնց որոշ մասը կարող է թերապևտիկ նշանակություն ունենալ (որոշ ներդրեզեներատիվ պաթոլոգիաների դեպքում):

Հետազոտության արդյունքում պարզաբանվել է, որ *Macrovipera lebetina obtusa* և *Montivipera vaddei* օձերը պարունակում են մի շարք տարբեր տեսակի սպիտակուցներ, որոնք բաժանվում են երկու խմբերի՝ ֆերմենտներ (սերինային պրոտեազներ, Zn²⁺-կախյալ մետաղապրոտեազներ, ֆոսֆոլիպազ A₂) և ֆերմենտային ակտիվություն չունեցող սպիտակուցներ (C տիպի լեկտինանման սպիտակուցներ, դեզինտեգրիններ) : *Macrovipera lebetina* օձի թույնը, բացի Viperidae դասի օձերի թույնին բնորոշ պրոտեիններից, պարունակում է հենց իր տեսակին հատուկ սպիտակուցային բաղադրամասեր (նատրիուրետիկ պեպտիդներ, կարճ դեզինտեգրիններ (օբոուստատին), VEGF-նման պրոտեին և դեզինտեգրինանման պրոտեին /ցիստեինով հարուստ պրոտեին), իսկ *Montivipera vaddei* թույնը պարունակում է նաև Kunitz-տիպի սերինային պրոթեազների ինհիբիտոր: Քանի որ գյուրզայի Անդրկովկասյան ենթատեսակի թույնի բաղադրությունը ցուցաբերում է 4%-ից պակաս նույնատիպություն երկու այլ ենթատեսակների համեմատ, ինչը թույլ է տալիս առաջարկել այն որակավորել, որպես առանձին տեսակ:

Մեր սկզբնական հետազոտությունները նվիրված են *in vitro* և *in vivo* պայմաններում բնական թաղանթի վիճակի և հատկությունների փոփոխությանը *Macrovipera lebetina obtusa* և *Montivipera raddei* թույների ազդեցությամբ: Հետազոտությունները կատարվել են կենսաաֆիզիկական մեթոդների միջոցով: Մեր կողմից ցույց է տրվել, որ ԵԼԹ-ի մոդելավորումը օրգանիզմում ընթացող ցանկացած ախտաբանական իրավիճակի համար ունի մի շարք առավելություններ թունաբանական ուսումնասիրությունների համար: Ամփոփելով հետազոտությունները, կարելի է եզրակացնել, որ Հայկական օձերի թույնը չափազանց բարդ է կենսաբանական ակտիվ նյութերի քիմիական բաղադրությամբ, փոխազդում է նյարդային բջիջների թաղանթների հետ և հանգեցնում է օբյեկտացման մակարդակի նվազեցման լիպիդների հազեցվածության աստիճանից կախված: Մեր

փորձարարական արդյունքները վկայում են, որ առնետների տարբեր հյուսվածքներից ստացված լիպիդներից առաջացած ԵԼԹ-ի էլեկտրաքիմիական հատկությունները (էլ. դիմադրություն, էլ. հաղորդականություն և խզման պոտենցիալ) փոխվում են օձի թույնի ազդեցությամբ: Բացի այդ *Macrovipera lebetina obtusa*-ի թույնը առնետի ուղեղի միատեսակ լիպիդներից ստացված հսկա միաշերտ վեզիկուլներում (GUV) զգալի փոփոխությունների է բերում՝ վեզիկուլների թաղանթների աղավաղման, ինչպես նաև վեզիկուլների չափերի մեծացմանը և լիզիսի: Այս ազդեցությունները ամենայն հավանականությամբ խախտում են լիպիդների կառուցվածքի ամբողջականությունը և երկշերտի հոսելիությունը: Ցույց է տրված, որ օձի թույնի բաղադրիչները նախընտրում են ֆազային անցման մոտ գտնվող կարգավորված լիպիդային սուբստրատը և հատկապես ակտիվ են միցելային լիպիդների նկատմամբ:

Ուսումնասիրվել են ֆոսֆոլիպիդային և պրոտեոլիպիդային երկշերտ հսկա միալամել վեզիկուլների մոդիֆիկացիան այսպես կոչված K49, S49 և VL-PLA2 տոքսինների (անջատված *Macrovipera lebetina obtusa*, *Bothrops jararacussu*, և *Vipera ursinii renardi* օձերի թույներից) ազդեցության արդյունքում ֆլուորեսցենտային մանրադիտման և լուսաչափման եղանակներով ԱՆՍ, ՊՌՌԴԱՆ և ԼԱԻՌԴԱՆ ֆլուորեսցենտային զոնդերի օգնությամբ: Ցույց է տրված, որ տվյալ տոքսիններով մոդիֆիկացումը բերում է հետերոգեն լիպիդներից ձևավորված լիպոսոմների թաղանթի հոսելիության աճի սպիտակուց-լիպիդ կոնտակտի տեղամասում և լիպոսոմների տրամաչափի մեծացմանը առաջին դեպքում և էապես չի փոխում թաղանթի մորֆոլոգիան այլ դեպքերում: Բարիումի իոններով ճնշելով օձի թույնի ֆոսֆոլիպազ Ա2-ը ուսումնասիրել ենք դրա հետևանքով ստացված վեզիկուլների դեֆորմացիան: Նկարագրվող դեֆորմացիան տարբեր է տարբեր օձերի թույներից անջատված ֆոսֆոլիպազների ժամանակ և բնորոշվում է տոքսինի 49 տեղամասում ամինաթթվային մնացորդի տեղակայումով, ինչը և փոխում է թաղանթի հետ կապման տոպոլոգիան:

Կատարվել են նաև նմանատիպ հետազոտություններ առանձնացված ֆոսֆոլիպազ Ա2-ի և մարդու արյան էրիթրոցիտների ստվերների օգնությամբ նշված ֆլուորեսցենտային զոնդերի միջոցով: Իրականացվել են հետազոտություններ օբտուսատին և էքիստատին դեզինտեգրինների մարդու արյան էրիթրոցիտների ստվերների հետ կապման կինետիկ պատկերի պարզաբանման ուղղությամբ նորագույն գերմանական SAW- Instruments բիոսենսորային տեխնոլոգիայով, որը հիմնված է կապման ընթացքում չիպի մակերեսին ստեղծվող ակուստիկ տատանումների փոփոխության վրա: Նշված հետազոտության արդյունքում կարելի է խոսել երկու տեսակի ինտեգրինների արկայության մասին էրիթրոցիտների թաղանթում:

Կատարվել են հետազոտություններ ներկայումս առկա Զագրեբի արտադրության հակաթույնի պարասպեցիֆիկության և նշված օձերի թույների նկատմամբ կրոս-ռեակտիվության պարզաբանման նպատակով, որի արդյունքում հաստատվել է, որ նշված հակաթույնը մոտ տաս անգամ թույլ է չեզոքացնում տվյալ թույների առաջացրած լետալությունը և հեմոռագիկ և պրոթեոլիտիկ ակտիվությունը:

BIOPHYSICAL ASPECTS OF MEMBRANOTROPIC ACTION OF *MACROVIPERA*
LEBETINA OBTUSA AND *MONTIVIPERA RADDEI* VENOMS

ABSTRACT

Key words: chemiluminescence, disintegrins, electroporation, fluorescent probes, K49, *Macrovipera lebetina obtusa*, model membranes, *Montivipera vaddei*, PLA₂, surface acoustic waves.

Venoms from the Armenian mountain vipers *Macrovipera lebetina obtusa* and *Montivipera raddei* were analyzed by RP-HPLC, N-terminal sequencing, MALDI-TOF mass fingerprinting and CID-MS/MS. The venom proteins of MLO and MR belong to 9 and 11 families, respectively. The two mountain viper venoms share bradykinin-potentiating/C-natriuretic peptides, and proteins from the dimeric disintegrin, DC-fragment, CRISP, PLA₂, serine proteinase, C-type lectin-like, L-amino acid oxidase, and Zn²⁺-dependent metalloproteinase families, albeit each species exhibits distinct relative abundances. MLO and MR venoms contain unique components, e.g. the short disintegrin obtustatin in *M.l. obtusa*, and Kunitz-type serine proteinase inhibitor and VEGF-like molecules in *M. raddei*. The toxin formulation of MLO and MR venoms may be related to their adaptation to rocky mountain ecosystems. Using a similarity coefficient, we estimate that the similarity of venom proteins between *M. l. obtusa* and *M. l. transmediterranea* is less than 4%. Although this result would support the classification of *M.l. obtusa* as separate species, additional detailed genomic analyses are also required.

We investigated the balance of free radicals in different tissues (liver, heart, brain and muscle) of rats in course of *in vivo* and *in vitro* processing by MLO and MR snake venoms. During the *in vitro* processing chemiluminescence levels of tissue homogenates significantly decreased, while in course of *in vivo* intoxication the level of ChL were elevated in brain and liver; lipid peroxidation also increased in brain tissue, but there was no significant balance change in other tissues; the activity of superoxide dismutase mainly correlated with changes of free radical balance during intoxication. On the contrary, the activity of glutathione peroxidase was shown the reverse tendencies to chance. We suggest that free radicals and their oxidative stresses may play a role in the early stage of intoxication in causing the so-named “spreading-effect”, which is very characteristic of the venom of vipers.

Studies on the interaction of snake venom and organized lipid interfaces have been conducted using a variety of systems, including BLMs, and GUVs. The present study was undertaken to elucidate how the plastic properties (namely, its microviscosity, thickness, permeability) of model membranes from native lipids of different tissues of rats change in the course of MLO, MR and *Naja kaouthia* (NK) venoms processing. The presence of viper venom in organism lead to increasing of the electrical resistance of BLMs from liver and muscle lipids approximately on a sequence, while the BLMs from brain lipids has not shown a noticeable differences of plastic properties compare the control. Giant unilamellar vesicles (GUVs) with a mean diameter of 300µm have a minimum curvature and mimic cell membranes in this respect. The membrane fluorescence probes, ANS and pyrene, were used to assess the state of the membrane and specifically mark the phospholipid domains. Fluorescent spectra were acquired on a Varian fluorometer instrument.

The presence of viper venom in GUVs media reveals a noticeable decreasing of membrane fluidity compare the control, while the binding of fluorophores with GUVs modified by venom lead to appearance of channel activity. These studies also emphasize the importance of a membrane surface curvature for its interaction with enzymatic components of venom.

We describe the interaction of various phospholipases A₂ (PLA₂) from snake venoms of the family Viperidae (*Macrovipera lebetina obtusa*, *Vipera ursinii renardi*, *Bothrops asper*) with giant unilamellar vesicles (GUVs) composed of natural brain phospholipids mixture, visualized through fluorescence microscopy. The membrane fluorescent probes LAUDRAN and PRODAN were used to assess the state of the membrane and specifically mark the lipid packing and membrane fluidity. Our results have shown that the three PLA₂s which contain either of aspartic acid, serine, or lysine residues at position 49 in the catalytic center, have different effects on the vesicles. The PLA₂ with aspartic acid at this position causes the oval deformation of the vesicles, while serine and lysine-containing enzymes lead to an appreciable increase of fluorescence intensity in the vesicles membrane, wherein the shape and dimensions of GUVs have not changed, but in this case GUVs aggregation occurs. LAURDAN and PRODAN detect the extent of water penetration into the bilayer surface. We calculated generalized polarization function (GP), showing that for all cases (D49 PLA₂, S49 PLA₂ and K49 PLA₂) both LAUDRAN and PRODAN GP values decrease. A higher LAURDAN GP is indicative of low water penetration in the lipid bilayer in case of K49 PLA₂ compared with D49 PLA₂, whereas the PRODAN mainly gives information when lipid is in liquid crystalline phase.

In addition, determination of disintegrin-integrin complexation with Surface Acoustic Wave technique will be employed to measure the changes in kinetic parameters accompanying the disintegrin-receptor binding events in course of obtustatin and echistatin interaction with human erythrocyte ghost membranes. The result let us conclude about the presence of integrins in the erythrocyte membranes previously neglected.

Antivenom raised against the venom of nose-horned viper, *Vipera ammodytes ammodytes* (VAA) (European viper venom antiserum, Zagreb antivenom), contains neutralizing equine F(ab0)2 fragments that are clinically successful against homologous venom, but also against the venoms of several others medically important European snakes due to its paraspecific action. In this work we demonstrated that Zagreb antivenom is preclinically effective in neutralising lethal toxicity and hemorrhagicity of venoms of Armenian mountain snakes – *Montivipera raddei* and *Macrovipera lebetina obtusa* as well. In order to better understand the biochemical basis of the observed paraspecificity, the ability of anti-V. a. ammodytes serum to recognise and neutralise proteinases of the two venoms was also investigated. Anti- V. a. ammodytes serum showed surprisingly low capacity to inhibit metalloproteinases of both venoms included in the study, probably due to weak immunorecognition of their P-I representatives. Also, it completely failed to abolish enzymatic action of serine proteinases from *Macrovipera lebetina obtusa* venom. Relevance of such finding is yet to be established.

