



УДК 615.076.9+576.536:577.151

ОЧИЩЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ФОСФОЛІПАЗИ A_2 З ОТРУТИ *GLOYDIUS BLOMHOFFII BREVICAUDUS*

А. І. Жукова^{1,2}, Г. Л. Волков^{1,2}, Є. М. Краснобрижа¹, С. П. Гаврилюк¹

¹*Shijir International Co. Ltd., Долина Доців, Монголія
Bodi Tower building, office 901, Sukhbaatar square, P.O. Box-772, Ulaanbaatar-13, Mongolia*

²*Нейтромікс Україна ТОВ, вул. Мельникова, 12, Київ 04050, Україна
e-mail: zhukova0406@gmail.com*

Фосфоліпази A_2 (ФЛА2) є найбільш розповсюдженими компонентами отрути змій. Здатність впливати на клітинні взаємодії, а саме агрегацію тромбоцитів, ріст ракових клітин, процеси ангиогенезу та диференціювання клітин, робить цей фермент потенційним терапевтичним і канцеростатичним агентом у боротьбі зі злоякісними пухлинами. Зазначені потенційні лікувальні функції ФЛА2 потребують забезпечення високоочищеним ферментом.

Нами розроблено й апробовано спосіб отримання фосфоліпази A_2 з отрути *Gloydus blomhoffii brevicaudus*, який включає чотири послідовні стадії хроматографічного фракціонування. Очищена ФЛА2 є кислим білком із молекулярною масою 13762,86 Да та рІ 4,17. Розрахований рН оптимум дії ферменту становить 8,5. ФЛА2 здатна інгібувати АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів і виявляє цитотоксичний ефект. Здатність ФЛА2 індукувати диференціювання клітин лінії РС12, декларована деякими авторами, не виявлена.

Ключові слова: отрута змій, *Gloydus blomhoffii brevicaudus*, фосфоліпаза A_2 , рідинна хроматографія.

ВСТУП

Секреторні фосфоліпази A_2 (ФЛА2), зокрема фосфоліпази A_2 отрути змій, є водорозчинними низькомолекулярними (11–19 кДа) ферментами з ізоелектричною точкою від 4,0 до 10,5 та високою молекулярною стабільністю, яка обумовлена великою кількістю дисульфідних зв'язків у їхній структурі. Оптимальна каталітична активність ферментів спостерігається при рН 7,5–9,0 за наявності обов'язкового кофактора Ca^{2+} . Фармакологічні й токсичні властивості фосфоліпаз A_2 пов'язані з їхньою біохімічною активністю. ФЛА2 гідролізують ефірний зв'язок гліцерофосфоліпідів у положенні sn2 з утворенням лізофосфоліпідів і вільних ненасичених жирних кислот, арахідонової, пантатенової та інших [31]. Вивільнені жирні кислоти використовуються для утворення фізіологічно активних сполук (простагландинів, лейкотрієнів, тромбоксанів [9]) і разом з утвореним лізофосфоліпідом, який має лише

один жирнокислотний „хвіст”, здатні до утворення міцел, що забезпечує цим ліпідним сполукам потужні детергентні властивості. З детергентною дією вільних ненасичених жирних кислот і лізофосфоліпідів пов'язана здатність фосфоліпази A_2 до пошкодження клітинних мембран.

ФЛА2 є одним із основних токсичних компонентів отрути змій, проявляють нейро-, міо- та кардіотоксичну дію [28]. Зокрема, вони викликають деполаризацію м'язового волокна [21] і можуть поляризувати мембрану нервових закінчень [22]. ФЛА2 беруть участь у регуляції багатьох клітинних функцій, впливаючи на міжклітинну взаємодію або запускаючи ті чи інші сигнальні механізми. Так, показано, що вони інгібують агрегацію тромбоцитів [29], впливають на міграцію та ріст ендотеліальних клітин [9, 47], стимулюють ріст нейритів [23, 40, 51, 59], пригнічують адгезію, міграцію та ріст ракових клітин [18, 46, 53]. Дія ФЛА2 може бути результатом прямого гідролізу фосфоліпідів і порушення структури мембрани, або, як у більшості випадків, опосередкованою через залучення продуктів гідролізу в шляхи передачі сигналів [51, 59]. Здатність фосфоліпази A_2 впливати на проліферацію ракових клітин і процеси ангіогенезу робить її потужним терапевтичним агентом у боротьбі зі злоякісними пухлинами. Канцеростатична дія ФЛА2 проявляється через властивість індукувати або підсилювати процеси диференціювання клітин [7, 40] і може бути використана для пригнічення неконтрольованого росту пухлинної тканини.

Усе це є підґрунтям для створення промислових технологій отримання фосфоліпаз A_2 з отрути змій. Оскільки отрута змій містить багато інших біологічно активних молекул, наприклад, тромбіноподібних ферментів, активаторів протеїну С, активаторів протромбіну, інгібіторів агрегації тромбоцитів, факторів росту тощо, створення технології, яка б передбачала отримання кількох цільових білків за один цикл виробництва, дає змогу суттєво знизити собівартість продуктів за рахунок максимального ефективного використання сировини. Водночас дедалі розповсюдженішими стають технології отримання рекомбінантних білків/пептидів отрути змій. Однак, зважаючи на те, що в країнах Азії (Китай, Індія, Таїланд, В'єтнам) і Південної Америки (Бразилія, Аргентина, Перу, інші) заготовляють сотні кілограмів отрути змій [12, 16, 18, 19, 41, 49, 52], запропонований технологічний підхід зробить продукти, отримані з природної сировини, більш конкурентоздатними завдяки їхній низькій собівартості та природному походженню порівняно з рекомбінантними [2].

Предметом нашого дослідження була отрута змії виду *Gloydius blomhoffii brevicaudus*, одержана зі серпентаріїв Китаю. У наших попередніх роботах щитомордники були визначені назвою *Agkistrodon*, оскільки обидва роди дуже схожі між собою і обидві назви вживалися дослідниками як синоніми, однак у 90-ті роки ХХ ст. щитомордники Азії були відокремлені й отримали вірну назву *Gloydius*.

До теперішнього часу описано деякі фосфоліпази A_2 з отрути змій родів *Gloydius/Agkistrodon*. Так, з отрути *Agkistrodon (A.) acutus* було виділено фосфоліпазу A_2 з молекулярною масою 16,4 кДа, яка здатна інгібувати агрегацію тромбоцитів [15]. Іншими дослідниками клоновано аналог цього білка Lys-49 ФЛА2, що виявляв міотоксичну дію [20]. Три мономерних ФЛА2 було очищено з отрути *A. halys pallas*: кислу (рІ 4,5), нейтральну (рІ 6,9) та лужну (рІ 9,3) з молекулярними масами близько 14 кДа [15]. Кисла ФЛА2 у дослідях *in vivo* мала антитромботичний ефект [56]. Лужна ФЛА2 була сильним гемолітичним токсином, здатним гідролізувати фосфоліпіди мембрани *E. coli* у присутності бактерицидного/підвищуючого проникливості білка нейтрофілів [62]. Нейтральна ФЛА2 була токсином пресинаптичної спрямо-

ваності [25]. Також в отруті *A. halys blomhoffii* знайдено три ФЛА2: кислу (pI 4), нейтральну (pI 6,9) та лужну (pI 10,0) з молекулярними масами близько 14 кДа [24, 27]. За допомогою сайт-спрямованого мутагенезу Liu зі співробітниками створили 5 мутантних білків – аналогів кислої фосфоліпази A₂ з отрути *A. halys pallas*, визначивши таким чином, які положення амінокислотних залишків у структурі білка відповідають за інгібуючий вплив на агрегацію тромбоцитів [36]. Отрута *Gloydius (G.) ussuriensis* містить нейротоксичну Gln49-ФЛА2 – фосфоліпазу A₂ з молекулярною масою 13,8 кДа [12] і властивостями тромбіноподібної протеїнази [60]. Крім того, ФЛА2 з отрути змії цього виду здатна впливати на мембранні іонні канали, що лежить в основі її анагетичної дії [61]. Показано, що під час активації фосфоліпази A₂ з отрути *A. piscivorus piscivorus* на поверхні візикул з фосфотидилхоліну її афінність до іонів Ca²⁺ збільшувалася щонайменше на 3 порядки [34]. ФЛА2 з молекулярною масою 14,133 кДа з отрути *A. bilineatus* бере участь у процесах, що призводять до ушкодження м'язів [30]. З отрути *A. blomhoffii Siniticus* виділена і очищена ФЛА2 з молекулярною масою 13,9 кДа [37]. А з отрути *A. blomhoffii Ussurensis* – ФЛА2 з молекулярною масою 14,008±0,007 кДа та оптимальним рН дії 8,0–9,0 [54].

Метою нашого дослідження була розробка способу очищення та характеристика фосфоліпази A₂ з отрути змії виду *G. blomhoffii brevicaudus*, вміст якої було показано раніше [1].

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Кристалічну форму отрути *G. blomhoffii brevicaudus* отримували від Beijing Neutronics Imports & Exports Trading Co. Ltd., Китай.

Метод фракціонування цільної отрути на сорбенті Blue Sepharose 6FF описаний раніше [6].

Буфери готували на реактивах, отриманих від Sigma (Німеччина), якістю не нижче 99,5% основної речовини. Провідність і рН встановлювали у термостабілізованій атмосфері за +20°C на кондуктометрі GLP 31-32 і рН-метрі GLP 21-22 (Crison Instruments SA (Франція). Кондуктометри, рН-метри, датчики кондуктивності й рН-датчики хроматографів калібрували за стандартними розчинами Crison Instruments SA, Франція. Буфери, які використовували у хроматографічному процесі, та фракції протеїнів, які збирали, виражали в об'ємах хроматографічної колонки Vc.

Все обладнання та матеріали для хроматографії й електрофорезу одержано від GE Healthcare AB (Уппсала, Швеція).

У роботі використовували хроматографи серії АКТА (ÅKTAexplorer, ÅKTAbasic), оснащені програмою UNICORN 5.01. Хроматографію проводили на сорбентах Blue Sepharose 6FF, Q Sepharose HP, S Sepharose HP, SOURCE RPC та Superdex 200 PG, використовуючи набивні колонки типу XK або готові до застосування колонки типу HiLoad, HiPrep або HiTrap. Аналітичну хроматографію здійснювали на колонках Superdex 75/200 10/300 GL (>30 000×м⁻¹ теоретичних тарілок).

1D-електрофорез проводили на 12,5% SDS-ПААГ-платівках (10×10 см) за методом Laemmli [31], використовуючи системи вертикального електрофорезу білків Mini Vertical Unit SE 260, SE 660 Dual Cooled Vertical Unit. У першому напрямку 2D-електрофорезу ізоелектрофокусування проводили на Ettan IPGphor 2 IEF System у 7 см стрічках ПААГ Immobililine DryStrip Gels з нанесеним градієнтом рН 3,0–10,0 за стандартним протоколом виробника. При проведенні другого напрямку 2D-електрофорезу стрипи переносили на Mini-Vertical Unit SE 250 у 10–20% SDS-ПААГ платівку

розміром 100/105/0,75 мм. На платівку подавали напругу 3000–4000 В за сили струму 1000–2000 мА. Усі операції проводили за температури 4–6°C, застосовуючи циркуляційний термостат MultiTemp III. Стандарти молекулярної маси білків отримували від Fermentas (Литва) та GE Healthcare AB (Швеція).

Візуалізацію білків проводили фарбуванням платівок за допомогою нітрату срібла або кумасі блакитного R-350, на станції автоматичного забарвлення електрофореграм Processor Plus відповідно до стандартного протоколу виробника. Електрофореграми сканували на лазерному сканері Typhoon Trio Variable Mode Imager (програма ImageQuant TL).

Усі реагенти для мас-спектрометрії білків отримували від Sigma, Німеччина. Дослідження проводили на MALDI-TOF Bruker BIFLEX III мас-спектрометрі (Bruker Daltonics, USA) при довжині хвилі лазера 337×10^{-9} м за стандартною методикою виробника. 3 Інсулін бика (M^+H^+ , 5734.56) і цитохром С коня (M^+H^+ , 12361.09) використовували як зовнішні калібрувальні стандарти.

Зразки крові відбирали з вушної вени кролів у пластикову пробірку в співвідношенні 9:1 до 3,8% розчину лимоннокислого натрію. Плазму, збагачену тромбоцитами, отримували центрифугуванням стабілізованої крові за прискорення 150 g протягом 10 хв при 20°C.

Активність інгібітора агрегації тромбоцитів визначали у збагаченій тромбоцитами плазмі (не довше 3 годин зберігання) на агрегометрі AP2110 (Солар, Білорусь) за зниженням агрегації тромбоцитів, індукованої $2,5 \times 10^{-6}$ М АДФ (Технологія-Стандарт, Росія).

Активність фосфоліпази A_2 (ЕС 3.1.1.4, фосфатид-*m*-2-ацилгідролази) визначали за розщепленням специфічного флюорогенного субстрату PED-6 (Invitrogen, США) [10]. Питому активність фосфоліпази визначали за калібрувальною кривою по зовнішньому стандарту відомої активності фосфоліпази A_2 бика (Sigma, Німеччина).

Вміст білків у розчинах визначали за методом Бредфорда [11] з використанням стандартного розчину білка відомої концентрації (Fermentas, Литва).

Вимірювання інтенсивності забарвлення та флюоресценції продуктів розщеплення субстрату проводили на спектрофотометрі Ultrospec 3100pro, рідері планшетів Biotrak II Visible Plate Reader і лазерному сканері Typhoon Trio Variable Mode Imager (GE Healthcare AB, Швеція).

Для підготовки води класу WFI (water for injection) і класу HPLC-grade були застосовані системи Diamond RO Reverse Osmosis System, NANOpure Diamond Water Purification System та Mega-Pure Distillation System (Barnstead International, США).

Клітинні лінії PC12 (феохромомітома щура), які були отримані з Європейського банку клітинних ліній (European Collection of Cell Cultures – ECACC), вирощували на середовищі DMEM, з 2×10^{-3} М глутаміну, $100 \text{ МО} \times \text{мл}^{-1}$ пеніциліну, 100×10^{-6} г $\times \text{мл}^{-1}$ стрептоміцину, 10% сироватки коня (HS) та 5% ембріональної телячої сироватки (FBS) (Sigma, Німеччина). Для визначення цитотоксичності клітини висаджували у 24-лункові пластикові планшети і вирощували до досягнення 80% конфлюентності. Потому ростове середовище видаляли, клітини промивали фосфатним буфером та в кожну лунку додавали 1 мл безсироваткового середовища, в яке вносили досліджуваний зразок в об'ємі, що не перевищував 10% загального об'єму середовища в лунці; в контрольні лунки додавали такий самий об'єм буфера, в якому розчиняли зразок. Через 48 год культивування визначали кількість живих клітин за методом включення тріазолілу блакитного [39].

Для вивчення диференціювання клітини лінії PC-12 висаджували у 24-лункові планшети, вкриті полі-D-лізином у щільності 4×10^4 кл/см². Після прикріплення клітин (приблизно через 6 год) ростове середовище замінювали середовищем для стимулювання – DMEM, що містило 2×10^{-3} М глутаміну, 1% HS, 0,5% FBS, 100 МО×мл⁻¹ пеніциліну, 100 мкг×мл⁻¹ стрептоміцину. Зразки вносили у середовище стимулювання так, щоб їх об'єм не перевищував 10% об'єму середовища в лунці. За позитивний контроль слугував фактор росту нервів миші 2,5-S NGF у концентрації 50×10^{-9} г×мл⁻¹, за негативний контроль – такий самий об'єм DMEM без досліджуваного білка. Протягом 3–5 днів результати диференціювання клітин фотодокументували. За диференційовані приймали клітини, довжина відростків яких перевищувала довжину тіла.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті вхідного контролю отрути *G. blomhoffii brevicaudus* при виробництві ряду цільових білків було показано наявність не лише фосфоліпази A₂, але й високий вміст тромбіноподібного ферменту (thrombin-like enzyme – TLE) у її складі [1]. Оскільки TLE завдяки потужній активності суттєво перешкоджає подальшому виділенню та/або виявленню інших цільових компонентів, доцільним було в першу чергу відокремити його від решти протеїнів, зв'язавши з афінним сорбентом. Center of Excellence НВП Шижир (Монголія) було зареєстровано міжнародний патент щодо першого етапу виробництва тромбіноподібних ензимів з отрути змії афінною хроматографією на Blue Sepharose 6FF [56]. Під час застосування даного методу для отрути *G. blomhoffii brevicaudus* отримали фракцію білків, які не зв'язалися зі сорбентом (ФНБ_{BS}) і 3 протеїнові фракції, що елюювалися в градієнті NaCl [6]. Аналіз фракцій на функціональну активність показав, що ФНБ_{BS} містила білок з активністю фосфоліпази A₂. У даному дослідженні проводили подальшу розробку технології промислового отримання фосфоліпази A₂ із фракції білків отрути *G. blomhoffii brevicaudus*, які не зв'язувалися з Blue Sepharose 6FF на першому етапі фракціонування цільної отрути.

Очищення та характеристика фосфоліпази A₂

Методи хроматографічного очищення біологічних молекул посідають перше місце при розробці технологій ефективного очищення протеїнів. Поєднання різних хроматографічних підходів, які розділяють білки за різними фізико-хімічними характеристиками, та підбір оптимальних умов процесів дає змогу очистити декілька навіть дуже схожих цільових компонентів в одному технологічному циклі [3].

На перших стадіях промислового виробництва білків, беручи до уваги великі об'єми зразків і багатокомпонентність фракцій, найбільш ефективним є метод іонообмінної хроматографії (IOX), який широко застосовується для очищення білків/пептидів з отрути змії [25–27].

Для першого етапу очищення фосфоліпази A₂ нами була обрана IOX на сорбенті Q Sepharose HP, оскільки попередніми дослідженнями було показано, що за рН буфера 6,2 майже усі цільові протеїни, що пройшли хроматографію на Blue Sepharose 6FF, мали від'ємний заряд [3] і зручно було наносити зразок безпосередньо на колонку зі сильним аніонообмінним адсорбентом, який давав змогу варіювати рН та склад буфера кондиціювання зразка. Так було визначено, що найкраще розділення білків на Q Sepharose HP спостерігалось за рН 9,1 з однаковою ефективністю у двох буферах: 20×10^{-3} М імідазол-НСІ та 20×10^{-3} М трис-НСІ [3], але

використання останнього буфера є більш економічно вигідним за рахунок меншої вартості його компонентів. На жаль, за рН 9,1 активність одного із цільових білків стрімко зменшувалася. Зниження рН буфера до 8,2 забезпечувало задовільне розділення цільових протеїнів і збереження їхньої біологічної активності [3].

У результаті розділення ФНБ_{SB} з Sepharose Blue 6FF на аніонообмінному адсорбенті Q Sepharose HP було отримано ФНБ_{SQ} та 10 фракцій (F1–F10), які елюювали з колонки градієнтом NaCl (рис. 1).

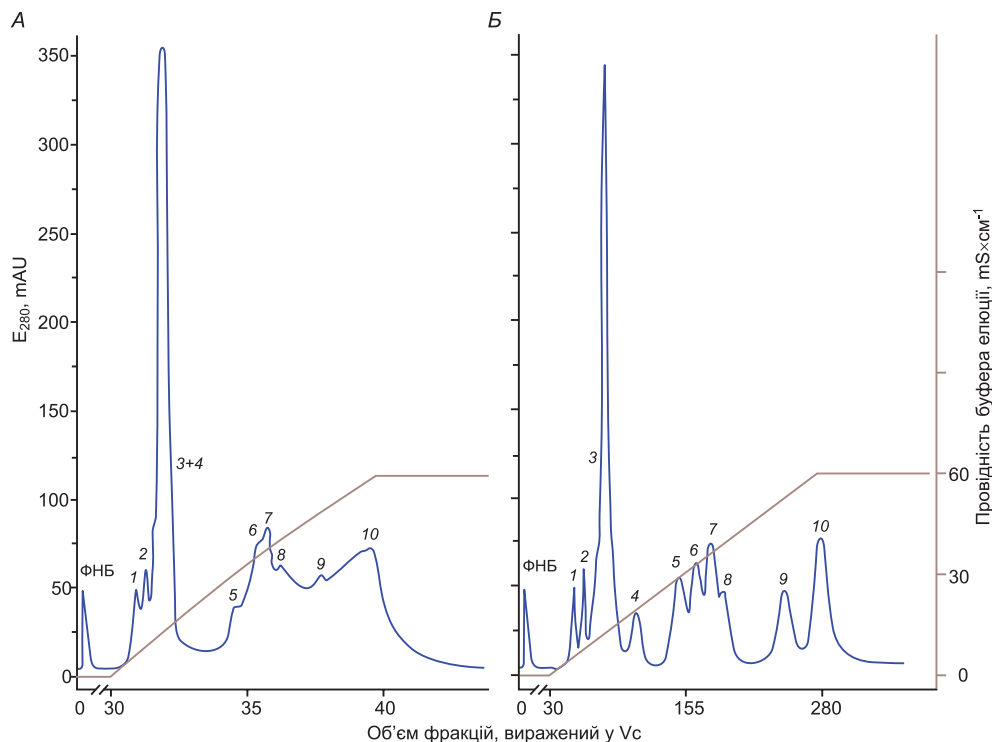


Рис. 1. Хроматограми розділення білків отрути *G. blomhoffii brevicaudus*, які не зв'язалися з Blue Sepharose 6FF (ФНБ_{SB}), на Q Sepharose HP. Зразки в 20×10^{-3} М імідазол-НСІ буфері, рН 6,2 наносили на колонку ХК 16/20 зі швидкістю $1 \text{ мл} \times \text{хв}^{-1}$. Колонку промивали $10 \text{ Vc } 20 \times 10^{-3}$ М трис-НСІ буфера, рН 8,2, елюцію протеїнів здійснювали лінійним градієнтом NaCl з кондуктивністю $(1\text{--}60) \times 10^{-3} \text{ S} \times \text{см}^{-1}$ зі швидкістю $5 \text{ мл} \times \text{хв}^{-1}$.

А – висота шару адсорбента 12,5 см ($Vc=25$ мл), об'єм градієнта 10 Vc; Б – висота шару адсорбента 0,5 см ($Vc=1$ мл), об'єм градієнта 250 Vc

Fig. 1. Q Sepharose HP chromatographic separation of *G. blomhoffii brevicaudus* venom proteins unbound on Blue Sepharose 6FF (UB_{SB}). Samples in 20×10^{-3} M imidazole-HCl buffer, pH 6.2 were applied to a column XK 16/20 with a flow rate of $1 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$. The column was washed with $10 \text{ Vc } 20 \times 10^{-3}$ M tris-HCl buffer, pH 8.2, protein elution was performed with a line gradient of NaCl with conductivity of $(1\text{--}60) \times 10^{-3} \text{ S} \times \text{cm}^{-1}$ with a flow rate of $5 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$.

А – chromatographic gel layer height 12.5 cm ($Vc=25$ ml), gradient volume 10 Vc; Б – chromatographic gel layer height 0.5 cm ($Vc=1$ ml), gradient volume 250 Vc

Функціональні тести показали, що фракція F3 виявляла A_2 -фосфоліпазну активність, однак погано розділялася з фракціями 1 та 2 у застосованих умовах хроматографії на Q Sepharose HP.

Вдосконалення підходу до елюції білків у градієнті NaCl дало змогу ефективно розділити близькі за фізико-хімічними властивостями білки (рис. 1, А і Б). Застосувавши більш точний ступінчастий градієнт, ми якісно відокремили фракції 1 (F1+F2 – об'єднані), 2 (F3, що містила цільовий білок), 3 (F4), 4 (F5+F6+F7+F8 – об'єднані), 5 (F9) та 6 (F10) (рис. 2). У результаті аналізу біологічної активності фракцій було визначено, що фракція 2 мала потужну A₂-фосфоліпазну активність.

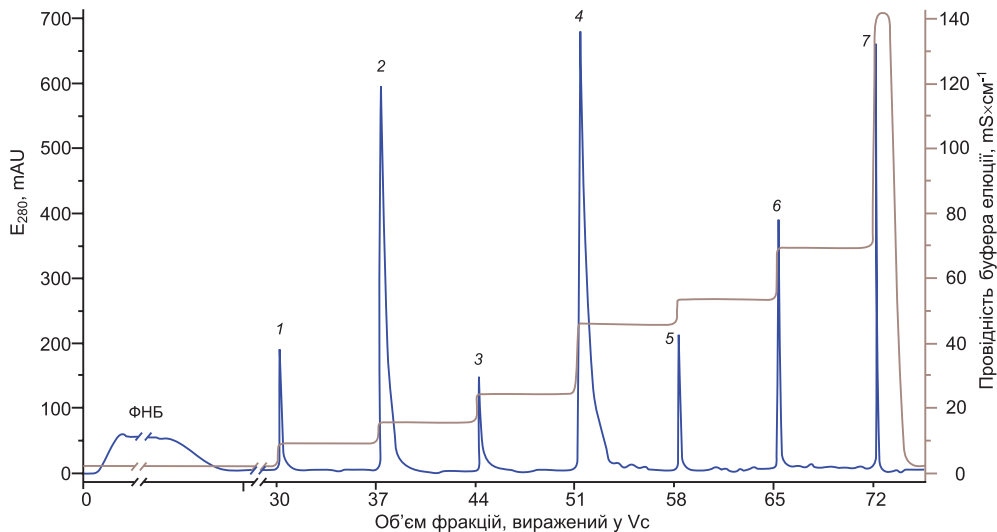


Рис. 2. Хроматограми розділення білків отрути *G. blomhoffii brevicaudus* з ФНБ_{BS} на Q Sepharose HP в описаних умовах із застосуванням елюції 7-ступінчастим (у межах 9–145 мS×см⁻¹) градієнтом NaCl у 20×10⁻³ М трис-НСІ буфері, рН 8,2, зі швидкістю 5 мл×хв⁻¹

Fig. 2. Industrial Q Sepharose HP chromatographic separation of *G. blomhoffii brevicaudus* venom proteins unbounded on Blue Sepharose 6FF (UB_{BS}) in the described conditions using 7 steps NaCl elution gradient in 20×10⁻³ M Tris- HCl buffer, pH 8.2, buffer flow rate – 5 ml×min⁻¹

За результатами експрес-аналізу на колонці з Superdex 75 [1] було показано, що активність ФЛА2 з фракції 2 після Q Sepharose HP локалізована в зоні низькомолекулярних білків із молекулярною масою приблизно 14 кДа, що знаходить підтвердження у даних літератури [27].

Результати електрофорезу в ПААГ засвідчили, що фракція 2, отримана з Q Sepharose HP (рис. 3), містила основний білок, з молекулярною масою 12–14 кДа та домішки білків з молекулярними масами близько 19, 55, 65 і 75 кДа (рис. 3, трек 2).

На наступному етапі простим способом можна було б відділити основний білок від домішок за допомогою хроматографії, що розділяє за розміром. Але, оскільки різниця між молекулярними масами основного та найближчого за масою білка, який „забруднює”, була невеликою, ми використали інші два види хроматографії, щоб обрати той, що забезпечить найкраще розділення цільового білка та домішок.

Перша спроба очищення на катіонообмінному адсорбенті S Sepharose HP суттєвого результату не дала (рис. 4, А): з визначених на хроматограмі восьми індивідуальних піків білків розділеними були тільки мінорні піки 7 і 8, цільовий пік 3 не відокремлювався від домішкових піків 1, 2, 4, 5 і 6, а пік 9 включав суміш усіх денатурованих у процесі хроматографії білків.

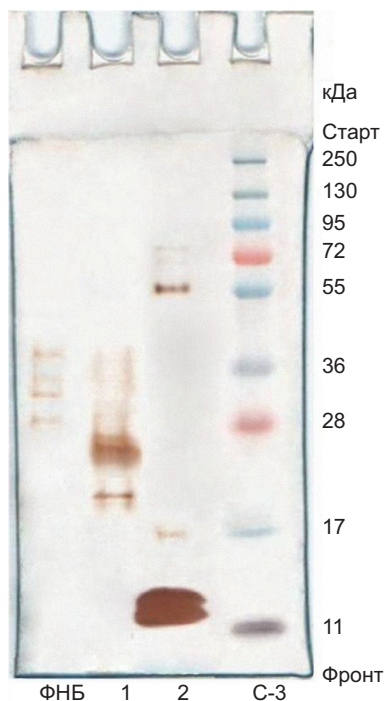


Рис. 3. Електрофореграма фракцій білків, отриманих у результаті хроматографії на Q Sepharose HP. Електрофорез проводили на 12,5% SDS-ПААГ-платівках (10×10 см) за методом Laemmli [31]:

ФНБ – фракція білків, що не зв'язалися з Q Sepharose HP (ФНБ_Q); 1 – елюювана фракція 1; 2 – елюювана фракція 2; C-3 – стандарти молекулярних мас білків

Fig. 3. SDS-PAAG Electrophoresis of protein fractions obtained after Q Sepharose HP chromatographic separation. Electrophoresis was performed on 12.5% SDS-PAAG-plates (10×10 cm) by Laemmli method [31]:

ФНБ – fraction of the proteins unbound to Q Sepharose HP (UB_Q); 1 – eluted fraction 1; 2 – eluted fraction 2; C-3 – protein molecular weight standards

Хоча основна активність ФЛА2 була виявлена у фракції 3, вона також значною мірою була присутня як у фракціях 1 і 2, так і у фракціях 4–7. Незадовільне відділення ФЛА2 від інших білків підтверджують також і результати електрофорезу: білок із молекулярною масою фосфоліпази A₂ (~14 кДа) присутній у всіх аналізованих фракціях (рис. 5, треки 2–4).

З огляду на це, застосували хроматографію на звернених фазах на адсорбенті SOURCE 15RPC (колонка RESOURCE RPC 3 мл). Цей тип хроматографії хоча і виконується в доволі жорстких умовах (низька або висока рН, наявність розчинників у буфері), однак широко використовується для отримання низькомолекулярних компонентів отрути змій, зокрема ФЛА2, які є високостабільними [31].

У результаті хроматографії на SOURCE RPC фракції 2 з Q Sepharose HP було досягнуто більш високе очищення фосфоліпази A₂, ніж на катіонообміннику: отримано ФНБ_{RPC} і добре розділені 8 фракцій білків, з яких висока A₂-фосфоліпазна активність виявлена лише у фракції 7 (рис. 4, Б). Треба відзначити, що 0,02% активності ФЛА2 спостерігалось також у фракції 8, але у вигляді слідової домішки, з питомою активністю 18 МО×мг⁻¹ загального білка фракції. Дані електрофорезу (рис. 5, треки 5–8) підтверджують майже повне відокремлення ФЛА2 (рис. 5, трек 7) від білків зі сусідніх фракцій (рис. 5, треки 6 і 8). Лише деяка асиметричність піку 7 (рис. 4, Б) та білкова пляма в зоні молекулярної маси 55–65 кДа (рис. 5, трек 7) свідчать про наявність незначної домішки, можливо, з фракції 8 (рис. 4, Б). Функціональні тести показали, що досліджуваний білок із фракції 7 (рис. 4, Б) зберігав активність фосфоліпази A₂ після усіх стадій очищення.

Заключну, полірувальну стадію очищення фосфоліпази A₂ (видалення слідових високомолекулярних домішок і розчинника та переведення білка в нейтральне середовище) здійснювали на Superdex 200 PG (рис. 6) і досягли відокремлення цільо-

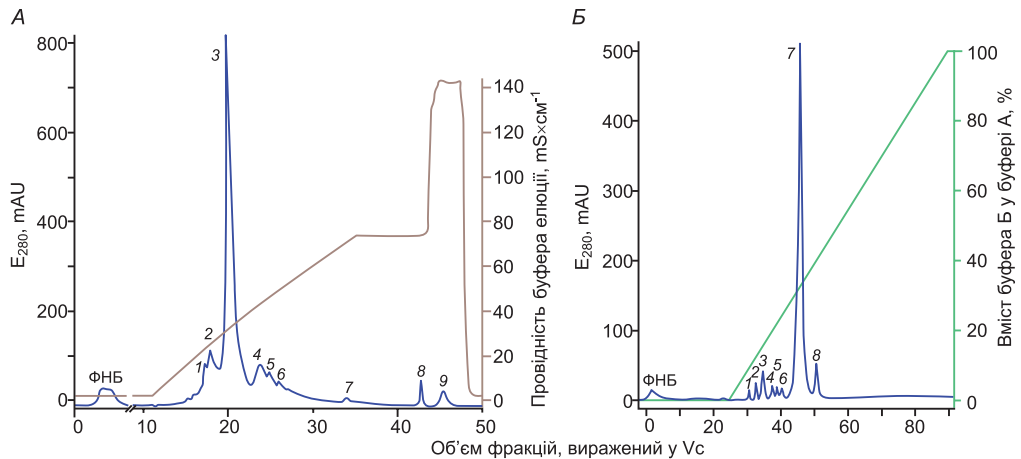


Рис. 4. Хроматограма процесу очищення фосфоліпази A₂ з отрути щитомордника *G. blomhoffii brevicaudus* на S Sepharose HP (A) та SOURCE RPC (Б) послідовно очищеної на Blue Sepharose 6FF (фракція ФНБ_{SB}) та Q Sepharose HP (фракція 2):

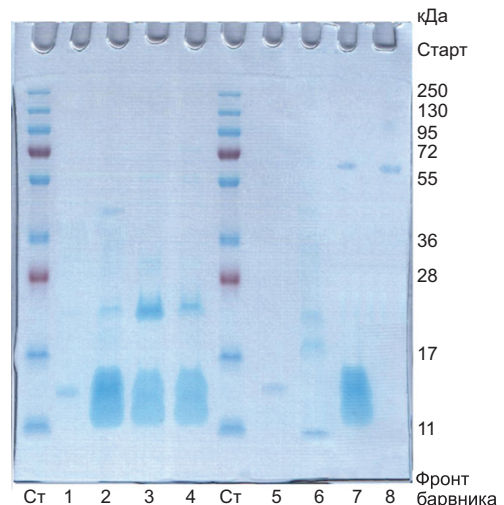
A – зразок наносили на колонку XK 16/20 в 20×10^{-3} M Na-ацетатному буфері, pH 3,6, зі швидкістю $1 \text{ мл} \times \text{хв}^{-1}$. Елюцію здійснювали лінійним у межах $(9-75) \times 10^{-3} \text{ S} \times \text{см}^{-1}$ градієнтом NaCl в 20×10^{-3} M Na-ацетатному буфері, pH 3,6, зі швидкістю $5 \text{ мл} \times \text{хв}^{-1}$; Б – зразок наносили на колонку RE-SOURCE 3 мл в 10×10^{-3} M NaOH, який вміщував 2% ацетонітрилу (буфер А), pH 3,6, і зі швидкістю $1 \text{ мл} \times \text{хв}^{-1}$. Елюцію здійснювали лінійним градієнтом буфера Б (10×10^{-3} M NaOH, який вміщував 80% ацетонітрилу) в буфері А зі швидкістю $1 \text{ мл} \times \text{хв}^{-1}$.

Fig. 4. S Sepharose HP (A) and SOURCE RPC (B) chromatographic purification of phospholipase A₂ from *G. blomhoffii brevicaudus* venom consecutively purified on Blue Sepharose 6FF (UB_{SB}) and Q Sepharose HP (fraction 2):

A – sample was applied to XK 16/20 column in 20×10^{-3} M Na-acetic buffer, pH 3.6, with a flow rate of $1 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$. Elution was performed by line gradient $(9-75) \times 10^{-3} \text{ S} \times \text{cm}^{-1}$ of NaCl in 20×10^{-3} M Na-acetic buffer, pH 3.6, with a flow rate of $5 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$; B – sample was applied to RESOURCE 3 ml column in 10×10^{-3} M NaOH, containing 2% of acetonitrile (buffer A), pH 3.6, with a flow rate of $1 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$. Elution was performed by line gradient of buffer B (10×10^{-3} M NaOH, containing 80% of acetonitrile) in buffer A with a flow rate of $1 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$.

Рис. 5. Електрофореграма білкових фракцій, отриманих у результаті розділення на S Sepharose HP та SOURCE RPC. Електрофорез проводили на 12,5% SDS-ПААГ-платівках (10×10 см) за методом Laemmli [31]: 1 – ФНБ з S Sepharose HP; 2 – фракція 1 з S Sepharose HP; 3 – фракція 2 з S Sepharose HP; 4 – фракція 3 з S Sepharose HP; 5 – ФНБ з SOURCE RPC; 6 – фракція 6 з SOURCE RPC; 7 – фракція 7 з SOURCE RPC; 8 – фракція 8 з SOURCE RPC; Ст – стандарти молекулярної маси білків

Fig. 5. SDS-PAAG electrophoresis protein fractions obtained after separation on S Sepharose HP and SOURCE RPC. Electrophoresis was performed on 12.5% SDS-PAAG-plates (10×10 cm) by Laemmli method [31]: 1 – unbound on S Sepharose HP protein fraction; 2 – fraction 1 from S Sepharose HP; 3 – fraction 2 from S Sepharose HP; 4 – fraction 3 from S Sepharose HP; 5 – unbound on SOURCE RPC protein fraction; 6 – fraction 6 from SOURCE RPC; 7 – fraction 7 from SOURCE RPC; 8 – fraction 8 from SOURCE RPC; Ст – protein molecular weight standards



вого білка (рис. 6, пік 2) від домішок (рис. 6, пік 1). Ступінь очищення, визначений по підвищенню питомої активності ферменту від цільної отрути ($0,177 \text{ МО} \times \text{мг}^{-1}$ білка) до гомогенного білка ($2867 \text{ МО} \pm \text{мг}^{-1}$ білка), досягала 16 000 разів. Отримана питома активність гомогенного ферменту, виміряна відносно відомого стандарту, відповідала літературним даним [43, 44, 50].

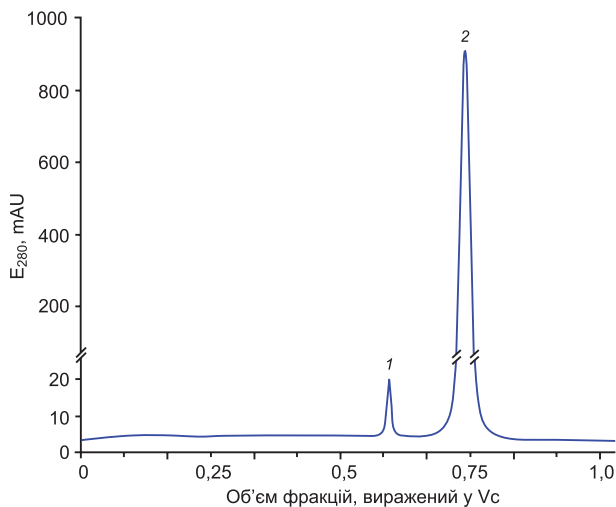


Рис. 6. Хроматограма процесу очищення фосфоліпази A_2 отрути *G. blomhoffii brevicaudus* на Superdex 200 PG, послідовно очищеної на Blue Sepharose 6FF (фракція ФНБ_{SB}), Q Sepharose HP (фракція 2) та SOURCE RPC (фракція 7). Процес проводили на колонці HiLoad 26/60 Superdex 200 PG у 20×10^{-3} М імідазол-НСІ буфері, рН 7,0, зі швидкістю $1,2 \text{ мл} \times \text{хв}^{-1}$

Fig. 6. Superdex 200 PG polishing chromatographic purification of phospholipase A_2 from *G. blomhoffii brevicaudus* venom consecutively purified on Blue Sepharose 6FF (UB_{SB}), Q Sepharose HP (fraction 2) and SOURCE RPC (fraction 7). The process was held on HiLoad 26/60 Superdex 200 PG column in 20×10^{-3} M imidazole-HCl buffer, pH 7.0, with a flow rate of $1.2 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$

За даними 2D електрофорезу фосфоліпаза A_2 була отримана в гомогенному вигляді (рис. 7). Молекулярна маса ферменту становила близько 14 кДа, а його ізоелектрична точка – 4,17, що свідчить про кислу природу очищеного ферменту. Розрахований рН оптимум ферменту дорівнював 8,5, що є розповсюдженим значенням для ФЛА2 отрути змій [31]. Молекулярна маса білка була визначена у подальшому MALDI-TOF мас-спектрометричному аналізі і становила 13762,86 Да (рис. 8).

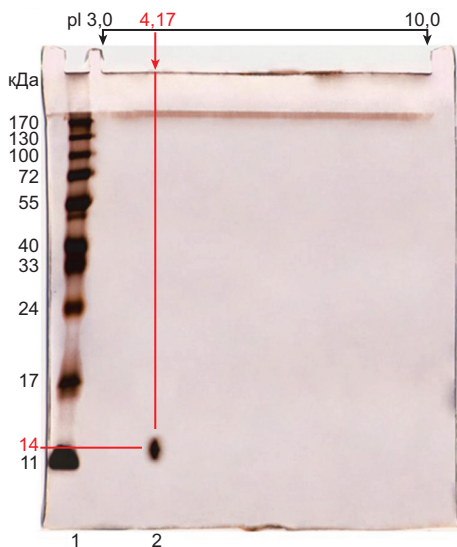


Рис. 7. 2D-електрофореграма фосфоліпази A_2 отрути *G. blomhoffii brevicaudus*, послідовно очищеної на Blue Sepharose 6FF, Q Sepharose HP, SOURCE RPC і Superdex 200 PG. Ізоелектрофокусування проводили в 7 см стрічках ПААГ з нанесеним градієнтом рН 3,0–10,0. Другий напрям 2D-електрофорезу проводили в 10–20% SDS-ПААГ 100/105/0,75 мм платівках під напругою 3000–4000 В за сили струму 1000–2000 мА та температури 4–6°C

Fig. 7. 2D electrophoresis of phospholipase A_2 from *G. blomhoffii brevicaudus* venom consecutively purified on Blue Sepharose 6FF, Q Sepharose HP, SOURCE RPC and Superdex 200 PG. Isoelectrofocusing was held in 7 cm PAAG strips with immobilized pH gradient of 3,0–10,0. The second direction was held on 10–20% SDS-PAAG 100/105/0.75 mm plates, with voltage of 3000–4000 V current strength of 1000–2000 mA and temperature 4–6°C

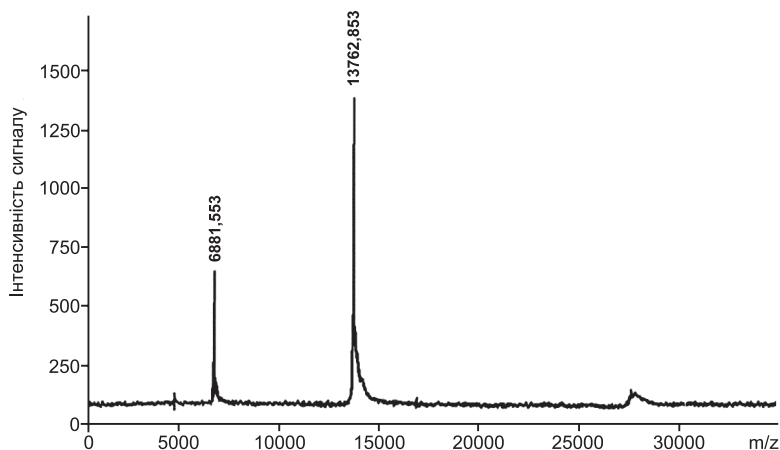


Рис. 8. MALDI-TOF мас-спектрограма фосфоліпази A₂ отрути *G. blomhoffii brevicaudus*, послідовно очищеної на Blue Sepharose 6FF, Q Sepharose HP, SOURCE RPC та Superdex 200 PG. Визначена молекулярна маса білка **13762,86** Да

Fig. 8. MALDI-TOF mass-spectrogram of phospholipase A₂ from *G. blomhoffii brevicaudus* venom consecutively purified on Blue Sepharose 6FF, Q Sepharose HP, SOURCE RPC and Superdex 200 PG. Estimated molecular weight is **13762.86** Da

Отримані дані збігаються з даними інших дослідників, які показали наявність в отруті різних видів щитомордників кислої фосфоліпази A₂ з молекулярною масою близько 14 кДа [14, 27].

Дослідження здатності фосфоліпази A₂ впливати на АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів

Як зазначалося раніше, фосфоліпази багатьох видів щитомордників здатні інгібувати агрегацію тромбоцитів. До того ж *Chen* та співавтори показали [15], що, хоча в отруті *A. halys pallas* присутні три типи ФЛА2 – лужна, нейтральна і кисла, – лише кисла ФЛА2 інгібувала агрегацію тромбоцитів. Оскільки очищена нами ФЛА2 є кислим білком, ми перевірили її на здатність інгібувати АДФ-індуковану агрегацію крові у плазмі, збагаченій тромбоцитами. Результати показали дозозалежний ефект інгібування за умови попередньої інкубації білка з тромбоцитами протягом 5 хв (рис. 9), ID_{50%} при цьому дорівнювала 9×10^{-6} г або 647×10^{-9} М білка, що корелювало з даними літератури [26].

Rudramaji зі співавторами [48] показали, що кислі фосфоліпази A₂ з отрути індійської кобри (*Naja naja naja*) мали дозозалежний, але різний за силою ефект інгібування агрегації тромбоцитів, індукованої АДФ, колагеном або епінефрином. Вони не впливали на агрегацію, що була стимульована арахідонатом. Хімічні сполуки, що модифікували структуру ферменту й інгібували фосфоліпазну активність, водночас знімали антитромботичний ефект, доводячи, що каталітична функція фосфоліпази A₂ є відповідальною за інгібуючий вплив на агрегацію тромбоцитів. Іншими дослідниками було показано, що така функція кислих фосфоліпаз опосередкована саме лізофосфоліпідами, які утворюються в результаті каталітичної дії ферменту [14, 55]. З іншого боку, встановлені випадки, коли інгібуючий вплив кислих фосфоліпаз A₂ з отрути змії роду *Gloydius (Agkistrodon)* на агрегацію тромбоцитів не залежав від їхньої можливості піддавати гідролізові фосфоліпіди й утворювати їх лізоформи [42].

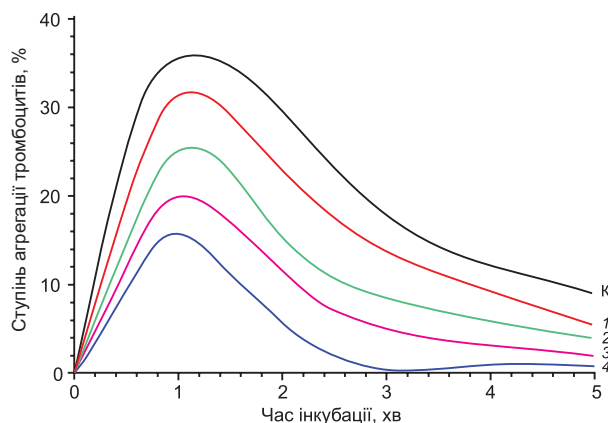


Рис. 9. Вплив фосфоліпази A_2 з отрути *G. blomhoffii brevicaudus* на АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів у плазмі кролів, збагаченій тромбоцитами. Дозозалежний ефект інгібування білком, попередньо інкубованим з плазмою протягом 5 хв у концентраціях 165×10^{-9} М (1), 325×10^{-9} М (2), 650×10^{-9} М (3) і 1300×10^{-9} М (4), порівняно з контролем (К)

Fig. 9. Effect of phospholipase A_2 from *G. blomhoffii brevicaudus* venom on ADP-induced platelet aggregation in rabbit platelet-rich plasma. Dose dependent inhibition by 165×10^{-9} M (1), 325×10^{-9} M (2), 650×10^{-9} M (3) і 1300×10^{-9} M (4) of the protein 5 min pre-incubated with cells in comparison with control (K)

Таким чином, механізм впливу фосфоліпази A_2 на агрегацію тромбоцитів чітко не встановлений і потребує подальшого вивчення. Отриманий нами високоочищений фермент (питома активність – $2867 \text{ MO} \cdot \text{мг}^{-1}$, найбільша із описаних у літературі) дає можливість подальшого вивчення особливостей біологічної дії фосфоліпази A_2 .

Дослідження здатності ФЛА2 впливати на виживання та диференціювання клітин лінії PC10

Як зазначалося вище, фосфоліпази A_2 є одним із основних цитотоксичних компонентів отрути змій [4]. Водночас була показана здатність ФЛА2 викликати ріст нейритів, тобто запускати процеси диференціювання, у клітинах лінії PC12 [52].

Ця клітинна лінія складається з недиференційованих клітин феохромоцитоми щура і є класичною моделлю вивчення процесів диференціювання у нейрональний тип клітин.

Під час розробки методів вхідного контролю для отрути змій роду *Gloydius* нами була проведена порівняльна характеристика цитотоксичності отрут декількох видів змій даного роду і показано, що отрута виду *G. blomhoffii brevicaudus* характеризується однією з найвищих цитотоксичностей [1]. Ми пояснили такий результат тим, що дана отрута містить найвищу питому активність фосфоліпази A_2 із решти досліджуваних. Крім того, дослідження наявності фактора росту нервів в отруті *G. blomhoffii brevicaudus* не дали позитивного результату, жодна із фракцій отрути не викликала диференціювання клітин, а більшість із них, у тому числі і та, що містила ФЛА2, виявляли цитотоксичний ефект [1].

Зрозуміло, що під час вхідного контролю цільної отрути функціональні тести проводилися зі сумішшю білків. Отримавши очищену ФЛА2 в результаті застосування описаної технології, ми перевірили її вплив на клітини лінії PC12. Так було

показано, що при внесенні ФЛА2 у концентраціях 5×10^{-9} М (215 МО) та $0,5 \times 10^{-9}$ М (21,5 МО) в інкубаційне середовище протягом 48 год виживало 14 і 22% клітин, відповідно. Причому клітини не виявляли ознак диференціювання, на відміну від позитивного контролю – інкубування клітин у середовищі зі субодиноцею 2.5S-NGF фактора росту нервів миші, який сприяв виживанню клітин і викликав їх диференціацію (рис.10). Такі результати корелюють з даними, отриманими іншими дослідниками щодо дії даного діапазону доз ФЛА2 на клітини [35].

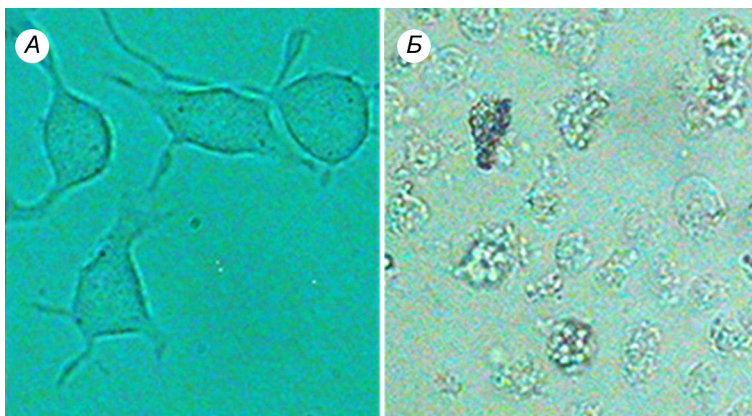


Рис.10. Клітини лінії PC12 ($\times 200$) після 48-годинної інкубації з А – 2.5S-NGF; Б – фосфоліпазою A₂ з отрути *G. blomhoffii brevicaudus*

Fig. 10. PC-12 cells ($\times 200$) after 48 hour incubation with 2.5S-NGF (A) and phospholipase A₂ from *G. blomhoffii brevicaudus* venom (B)

Макарова і співдослідники показали [5], що цитотоксичний ефект фосфоліпази A₂ з отрути змії на клітини PC12 обумовлений їхньою ферментативною активністю, що призводить до порушення цілісності цитоплазматичних мембран клітин. Водночас цитотоксичність ФЛА2 не пов'язана напряму зі здатністю до нейритогенезу, хоча здатність викликати ріст нейритів корелює з каталітичною функцією ФЛА2 [40]. Так було встановлено, що ріст нейритів PC12 індукується лізофосфотидилхоліном, який утворюється в результаті деградації фосфоліпідів клітини під дією ФЛА2 [59]. Тобто ФЛА2 проявляють свою дію за механізмом, відмінним від механізму дії фактора росту нервів, який зв'язується з рецепторами на поверхні клітин [33].

Показано, що ФЛА2 здатні диференціювати не лише нервові клітини. Так вони здатні посилювати диференціювання HL-60 клітин через утворення лізофосфатидилхоліну [7] та дозрівання дендритних клітин, проявляючи свою дію через ліпідні медіатори [45].

Хоча механізм цитотоксичної дії ФЛА2, опосередкований її каталітичною функцією, знаходить підтвердження у роботах й інших авторів [35], водночас є свідчення існування альтернативного механізму, який не пов'язаний зі здатністю ферменту гідролізувати фосфоліпіди мембрани. Вивчення токсину Nigexine з активністю ФЛА2 показало, що навіть за умови повного інгібування його фосфоліпазної активності він зберігав цитотоксичний вплив на клітини епітелію лінії FL, нейробластоми C-13T і промієлоклітинної лейкемії HL60 [17]. Міотоксин 2, Lys 49 гомолог ФЛА2 з отрути *Bothrops asper* викликав різні процеси у клітинах лінії лімфобластоми-B

ORL-8062 залежно від дози, доданої в культуру. За внесення токсину в найменшій концентрації, він викликав про-проліферативний ефект, за збільшення концентрації у 5 разів – апоптоз, а за десятикратних доз – некроз [38].

Очевидно, що механізм, за яким очищена нами фосфоліпаза A_2 з отрути *G. blomhoffii brevicaudus* проявляє свій токсичний вплив на клітини феохромоцитом, потребує подальшого вивчення. Водночас отримані дані є доказом токсичності досліджуваного ферменту щодо клітин пухлин і передумовою вивчення його антиракових властивостей.

ВИСНОВКИ

Розроблено спосіб отримання фосфоліпази A_2 з отрути *G. blomhoffii brevicaudus*, який включає чотири послідовні стадії хроматографічного розділення. Наведений підхід допускає паралельне очищення ряду інших цільових білків і тому забезпечує максимальне ефективне використання сировини та як наслідок – низьку собівартість продукції.

Показано, що отриманий білок є кислото фосфоліпазою з молекулярною масою **13762.86** Да та pI 4,17. Розрахований рН оптимум ферменту становить 8,5. ФЛА2 здатна інгібувати АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів і проявляє цитотоксичний ефект. Здатність ФЛА2 індукувати диференціювання клітин лінії PC12, декларована в роботах інших авторів, не виявлена.

1. Жукова А.І., Краснобрига Є.М., Гаврилюк С.П., Волков Г.Л. Розробка методів ідентифікації цільових білків отрути змій роду *Agkistrodon*. **Медицина хімія**, 2011, 13(3): 13–19.
2. Волков Г.Л., Гаврилюк Е.С. Инновационные технологии в биофармацевтике: модерн и традиции. **Фармацевтическая отрасль**, 2011; 28(5): 94–98.
3. Волков Г.Л., Краснобрига Е.Н., Гаврилюк С.П. и др. Промышленная хроматография белков с близкими физико-химическими свойствами. **Биофармацевтический журнал**, 2009; 1(4): 20–34.
4. Жукова А.И., Ганболд О., Карбовская В.Н. и др. Культура клеток как инструмент в разработке препаратов из компонентов яда змей. Цитотоксичность. **Биофармацевтический журнал**, 2010; 2(2): 3–8.
5. Макарова Я.В., Осипов А.В., Цетлин В.И., Уткин Ю.Н. Влияние фосфолипаз A_2 из ядов змей на рост нейритов и выживаемость клеточной линии PC12 феохромоцитомы крысы. **Биохимия**, 2006; 71(6): 838–846.
6. Скалка В.В., Краснобрига Е.Н., Волков Г.Л. и др. Получение и характеристика фибрино(гено)литического фермента из яда щитомордника рода *Agkistrodon blomhoffii*. **Биофармацевтический журнал**, 2010; 2(2): 32–39.
7. Asaoka Y., Yoshida K., Sasaki Y., Nishizuka Y. Potential role of phospholipase A_2 in HL-60 cell differentiation to macrophages induced by protein kinase C activation. **Proc Natl. Acad. Sci. USA**, 1993; 90(11): 4917–4921.
8. Balsinde J., Winstead M.V., Dennis E.A. Phospholipase A_2 regulation of arachidonic acid mobilization. **FEBS Lett**, 2002; 531: 2–6.
9. Bazaal A., Pasquier E., Defilles C. et al. MVL-PLA2, a Snake Venom Phospholipase A_2 , Inhibits Angiogenesis through an Increase in Microtubule Dynamics and Disorganization of Focal Adhesions. **PLoS ONE**, 2010, 5(4): e10124. doi:10.1371/journal.pone.0010124.
10. Benson M.A., Schmalzer K.M., Frank D.W. A sensitive fluorescence-based assay for the detection of ExoU-mediated PLA(2) activity. **Clin. Chim. Acta**, 2010; 411: 190–197.

11. *Bradford M.* A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**, 1976; 78: 248–254.
12. *Burke A.* Thailand's islands & beaches. Lonely planet publications Pty Ltd, 2008. 464 p.
13. *Chang Y., Li Y., Bao Y., An L.* Neurotoxic activity of Gln49 phospholipase A₂ from *Gloydius ussuriensis* snake venom. **J. Appl. Toxicol**, 2007; 27(5): 447–452.
14. *Chen R.H., Chen Y.C.* Isolation of an acidic phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon acutus* (five pace snake) and its effect on platelet aggregation. **Toxicon**, 1989; 27(6) 675–682.
15. *Chen Yuan-Ch., Maraganore M.J., Reardon I., Heinrichson L. R.* Characterization of the structure and function of three phospholipases A₂ from the venom of *Agkistrodon halys pallas*. **Toxicon**, 1987; 25(4): 401–409.
16. *Chopra R.N., Chopra I.C.* Indigenous drugs of India. **Academic publishers**, 2006; 3: 691.
17. *Chwetzoff S., Tsunasawa S., Sakiyama F., Manez A.* Nigexine, a phospholipase A₂ from cobra venom with cytotoxic properties not related to esterase activity. Purification, amino acid sequence, and biological properties. **J. of Biol. Chem**, 1989; 264: 13289–13297.
18. *Cindy A., Bruno L.* Antitumor effects of cationic synthetic peptides derived from Lys49 phospholipase A₂ homologues of snake venoms. **Cell Biology Int**, 2007; 31(3) 263–268.
19. *Dhaka M.K.* Bangladesh government plans to export snake venom. squammates.blogspot.com/bangladesh-government-plans-to-export.html, 2010.
20. *Fan C.Y., Qian Y.C., Yang S.L., Gong Y.* cDNA cloning and sequence analysis of Lys-49 phospholipase A₂ from *Agkistrodon acutus*. **Genet. Anal**, 1999; 15(1): 15–8.
21. *Fatehi M., Harvey A.L., Rowan E.G.* Characterisation of the effects of depolarising toxins on nerve terminal action potentials: apparent block of presynaptic potassium currents. **Toxicon**, 1998; 36(1): 115–129.
22. *Fatehi M., Rowan E.G., Harvey A.L., Harris J.B.* The effects of five phospholipase A-2 from the venom of king brown snake, *Pseudechis australis*, on nerve and muscle. **Toxicon**, 1994; 32(12): 1559–1572.
23. *Forlenza V.O., Mendes T. C., Marie K.N.S., Gattaz F. W.* Inhibition of phospholipase A₂ reduces neurite outgrowth and neuronal viability. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, 2007; 76(1): 47–55.
24. *Hanahan D.J., Joseph M., Morales R.* The isolation and characterization of a third or neutral phospholipase A₂ in the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. An improved fractionation procedure for all three enzymes. **BBA**, 1980; 619(3): 640–649.
25. *Jiang M., Haggblad J., Heilbronn E., Rydqvist B., Eaker D.* Some biochemical characteristics and cell membrane actions of a toxic phospholipase A₂ isolated from the venom of the pit viper *Agkistrodon halys* (Pallas). **Toxicon**, 1987; 25(7): 785–792.
26. *Jin Q., Yang L.X., Jiao H.M.* et al. Purification, gene cloning and expression of an acidic phospholipase A₂ from *Agkistrodon shedaoensis* Zhao. **Acta Biochim. Biophys. Sin**, 2004; 36(1): 27–32.
27. *Kawauchi S., Iwanaga S., Samejima Y., Suzuki T.* Isolation and characterization of two phospholipase a₂ from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, 1971; 236(1): 142–160.
28. *Kini R.M.* Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, 2003, 42: 827–840.
29. *Kini R.M.* **Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism**. (Ed) John Wiley, Chichester, England, 1997. P. 353–368.
30. *Komori Y., Ohara A., Nikai T.* Primary structure and pathological study of phospholipase A₂-I from *Agkistrodon bilineatus* (common cantil) venom. **J. Nat. Toxins**, 2002; 11(2): 139–147.
31. *Kudo I., Murakami M.* Phospholipase A₂ enzymes. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, 2002; 68–69: 53–58.
32. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 1970; 227: 680–685.

33. Landreth G.E., Shooter E.M. Nerve growth factor receptors on PC12 cells: ligand-induced conversion from low- to high-affinity states. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 1980; 77(8): 4751–4755.
34. Lathrop B., Gadd M., Biltonen L.R., Rule S.G. Changes in Ca²⁺ affinity upon activation of Agkistrodon piscivorus piscivorus phospholipase A₂. **Biochemistry**, 2001; 40(11): 3264–3272.
35. Liang Y.J., Yang X.P., Wei J.W. et al. Correlation of antitumor effect of recombinant sea snake basic phospholipase A₂ to its enzymatic activity. **Ch. J. of Cancer**, 2005; 24(12): 1474–1478.
36. Liu X., Wu X., Zhou Y. Identification of key residues responsible for enzymatic and platelet-aggregation-inhibiting activities of acidic phospholipase A₂S from Agkistrodon halys Pallas. **J. Nat. Toxins**, 2001; 10(1): 43–55.
37. Ma A.D., Wu S.Y., Zhang J.J. et al. Purification of a new phospholipase A₂ homologue from Agkistrodon blomhoffii siniticus and its effects on gene expression of Hep3B cells. **J. of Ch. Med. Mat**, 2006; 29(2): 132–134.
38. Mora R., Valverde B., Díaz C. et al. A Lys49 phospholipase A₂ homologue from Bothrops asper snake venom induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line. **Toxicon**, 2005; 45 (5): 651–660.
39. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. of Immun. Meth**, 1983; 65(1–2): 55–63.
40. Nakashima S., Kitamoto K., Arioka M. The catalytic activity, but not receptor binding, of sP-LA2s plays a critical role for neurite outgrowth induction in PC12 cells. **Brain Res**, 2004; 1015(1–2): 207–211.
41. O'Shea M. Venomous snakes of the world. **New Holland Publishers Ltd**, 2008, 2: 160.
42. Ouyang C., Yeh H.I., Huang T.F. A potent platelet aggregation inhibitor purified from Agkistrodon halys (mamushi) snake venom. **Toxicon**, 1983; 21: 797–804.
43. Panfoli I., Calzia D., Ravera S., Morelli A. Inhibition of hemorrhagic snake venom components: Old and new approaches. **Toxins**, 2010; 2(4): 417–427.
44. Perumal S.R., Gopalakrishnakone P., Ho B., Chow V.T. Purification, characterization and bactericidal activities of basic phospholipase A₂ from the venom of Agkistrodon halys (Chinese pallas). **Biochimie**, 2008; 90(9): 1372–1388.
45. Ramoner R., Putz T., Gander H. et al. Dendritic-cell activation by secretory phospholipase A₂. **Blood**, 2005; 105(9): 3583–3587.
46. Raoudha Zouari-K., Josa L., Aida K. et al. Two purified and characterized phospholipases A₂ from Cerastes cerastes venom, that inhibit cancerous cell adhesion and migration. **Toxicon**, 2009; 53(4): 444–453.
47. Rizzo M.T., Nguyen E., Aldo-Benson M., Lambeau G. Secreted phospholipase A(2) induces vascular endothelial cell migration. **Blood**, 2000; 96(12): 3809–3815.
48. Rudrammaji L.M.S., Machiah K. D., Krishna Kantha T.P., Gowda T. V. Role of catalytic function in the antiplatelet activity of phospholipase A₂ cobra (Naja naja naja) venom. **Mol. and Cell. Biochem**, 2001; 219(1–2): 39–44.
49. Sell-offer snake venom. www.aaaoe.com.
50. Sheffield M.J., Baker B.L., Li D. et al. Enhancement of Agkistrodon piscivorus piscivorus venom phospholipase A₂ activity toward phosphatidylcholine vesicles by lysolecithin and palmitic acid: Studies with fluorescent probes of membrane structure. **Biochemistry**, 1995, 34(24): 7796–7806.
51. Smalheiser N.R., Dissanayake S., Kapil A. Rapid regulation of neurite outgrowth and retraction by phospholipase A₂-derived arachidonic acid and its metabolites. **Brain Res**, 1996; 721(1–2): 39–48.
52. Snake venom farm in South Australia's Barossa Valley global pharmaceutical supplier. www.youtube.com.

53. Suchitra K., Narumol P., Orawan K. et al. Purification of a phospholipase A₂ from Daboia russelii siamensis venom with anticancer effects. **J. Venom Res**, 2011; 2: 42–51.
54. Sun M.Z., Ding L., Zhao D.Q., Ni J.Z. Purification and Characterization of A Phospholipase A(2) from Agkistrodon blomhoffii Ussurensis of Changbai Mountains. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, 1999; 31(1): 104–106.
55. Teng C.M., Kuo Y.P., Lee L.G., Ouyang C. Effect of cobra venom phospholipase A₂ on platelet aggregation in comparison with those produced by arachidonic acid and lysophosphatidylcholine. **Thromb. Res**, 1986; 44: 875–886.
56. Volkov G., Savchuk A., Karbovskyy V. WO 2008/020739 **Method for extracting α-specific thrombin-like enzyme (Ancistrin-B) from Agkistrodon blomhoffii ussuriensis venom**. 2008.
57. Wang Y., Cui G., Zhao M. et al. Bioassay-directed purification of an acidic phospholipase A(2) from Agkistrodon halys pallas venom. **Toxicon**, 2008; 51(7): 1131–1139.
58. Yuan Y., Jackson S.P., Newnham H.H. et al. An essential role for lysophosphatidylcholine in the inhibition of platelet aggregation by secretory phospholipase A₂. **Blood**, 1995; 86: 4166–4174.
59. Yutaka I., Naoko K., So-Hyun Ch. et al. Secretory phospholipases A₂ induce neurite outgrowth in PC12 cells through lysophosphatidylcholine generation and activation of G2A receptor. **J. of Biol. Chem**, 2005; 280(30): 28044–28052.
60. Zhang Q., Wang J., Han Y. et al. Identification of a novel thrombin-like phospholipase A₂ from Gloydus ussuriensis snake venom. **Blood Coagul. Fibrinolysis**, 2007, 18(8): 723–729.
61. Zhang Y., Jiang B., Li W. et al. Mechanisms of analgesic action of Gln49-PLA(2) from Gloydus ussuriensis snake venom. **Appl. Biochem. Biotechnol**, 2010, 160(3): 773–779.
62. Zhao K., Song S., Lin Z., Zhou Y. Structure of a Basic Phospholipase A₂ from Agkistrodon halys Pallas at 2.13 Å Resolution. **Acta Cryst**, 1998; 54: 510–521.

PHOSPHOLIPASE A₂ PURIFICATION AND CHARACTERIZATION FROM VENOM OF SNAKE *GLOYDIUS BLOMHOFFII BREVICAUDUS*

A. I. Zhukova^{1,2}, G. L. Volkov^{1,2}, Ye. N. Krasnobryzhaya¹, S. P. Gavryliuk¹

¹Shijir International Co. Ltd., Boroo Valley, Mongolia
Bodi Tower building, office 901, Sukhbaatar square, P.O. Box-772, Ulaanbaatar-13, Mongolia

²Neutromics Ukraine TOV, 12, Melnikova St., Kyiv 04050, Ukraine
e-mail: zhukova0406@gmail.com

Phospholipases A₂ (PLA₂) are the most common compounds of snake venom. Ability of the enzyme to affect cell interactions, particularly platelet aggregation, proliferation of cancer cells, processes of angiogenesis and cell differentiation, potentiates it as a therapeutic or cancerostatic agent in treatment of malignant tumors. Indicated potential medicinal functions of PLA₂ require high purified protein.

We developed and probated method for phospholipase A₂ obtaining from venom of snake *Gloydus blomhoffii brevicaudus*. The technology consists of four consecutive stages of chromatographic separation. Purified PLA₂ is acidic protein with molecular weight of 13762.86 Da and pI 4.17. Estimated optimal pH for the enzyme constitutes 8.5. PLA₂ inhibits ADP-induced platelet aggregation and exerts cytotoxic effect. Its ability to induce differentiation of PC12 cells, declared by other authors, was not shown.

Keywords: snake venom, *Gloydus blomhoffii brevicaudus*, phospholipase A₂, liquid chromatography.

ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА ФОСФОЛИПАЗЫ A₂ ИЗ ЯДА *GLOYDIUS BLOMHOFFII BREVICAUDUS*

А. И. Жукова^{1,2}, Г. Л. Волков^{1,2}, Є. М. Краснобрижа¹, С. П. Гаврилюк¹

¹*Shijir International Co. Ltd., Долина Дождей, Монголия
Bodi Tower Building, office 901, Sukhbaatar Square, P.O. Box-772, Ulaanbaatar-13, Mongolia*

²*Нейтромикс Украина ООО, ул. Мельникова, 12, Киев 04050, Украина
e-mail: zhukova0406@gmail.com*

Фосфолипазы A₂ (ФЛА2) являются наиболее распространенными компонентами яда змей. Способность влиять на клеточные взаимодействия, а именно агрегацию тромбоцитов, рост раковых клеток, процессы ангиогенеза и дифференцировки клеток делает ее потенциальным терапевтическим и канцеростатическим агентом в борьбе со злокачественными опухолями. Указанные потенциальные лечебные функции ФЛА2 требуют обеспечения высокоочищенным ферментом.

Нами разработан и опробован способ получения фосфолипазы A₂ из яда *Gloydus blomhoffii brevicaudus*, которая включает четыре последовательные стадии хроматографического фракционирования. Очищенная ФЛА2 является кислым белком с молекулярной массой 13762,86 Да и рI 4,17. Рассчитанный рН оптимум фермента составляет 8,5. ФЛА2 способна ингибировать АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов и проявляет цитотоксический эффект. Способность ФЛА2 индуцировать дифференцировку клеток линии РС12, декларированная некоторыми авторами, не выявлена.

Ключевые слова: яд змей, *Gloydus blomhoffii brevicaudus*, фосфолипаза A₂, жидкостная хроматография.

Одержано: 01.02.2012