



УДК 615.076.9+576.536:577.151

ОТРИМАННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ІНГІБІТОРА АГРЕГАЦІЇ ТРОМБОЦИТІВ ІЗ ОТРУТИ *GLOYDIUS BLOMHOFFII BREVICAUDUS*

А. І. Жукова, Г. Л. Волков

Shijir International Co. Ltd., Долина Дощів, Монголія
e-mail: zhukova0406@gmail.com

Отрута змій роду *Gloydius* є багатим джерелом протеїнів, здатних інгібувати агрегацію тромбоцитів. Такі протеїни або їх рекомбінантні аналоги є універсальним інструментом для вивчення процесів взаємодії білків і рецепторів у системі гемостазу. Разом з тим, уже вивчені та потенційно нові фармакологічні властивості інгібіторів агрегації тромбоцитів із отрути змій є підґрунтям для створення промислових технологій їх виробництва.

У даній роботі представлена частина технологічної розробки паралельного отримання кількох цільових білків із отрути *G. blomhoffii brevicaudus*, а саме етапів виробництва інгібітора агрегації тромбоцитів. Цільовий білок було очищено із застосуванням трьох різних хроматографічних підходів. Показано, що він є одноланцюговий протеїн з молекулярною масою 12001,55 Да, ізоелектричною точкою 8,03, який інгібував АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів кроля у плазмі, збагаченій тромбоцитами, з $ID_{50} = 3,26 \times 10^{-6}$ г або 542×10^{-9} М і не виявляв ензиматичної активності.

Ключові слова: отрута змій, *G. blomhoffii brevicaudus*, інгібітор агрегації тромбоцитів, хроматографія білків.

Отрута змій є багатим джерелом біологічно активних компонентів, здатних інгібувати агрегацію тромбоцитів за різними механізмами [28]. Дезінтегрини, що містяться в отруті *Viperidae* і *Crotalidae*, є специфічними інгібіторами агрегації тромбоцитів, які діють як антагоністи рецептора GP IIb/IIIa [29, 26]. На поверхні тромбоцитів фібриноген зв'язується з інтегрином IIb/IIIa, викликаючи взаємодію тромбоцит-тромбоцит, що є заключною стадією агрегації тромбоцитів, індукованої АДФ, тромбіном, колагеном і арахідоновою кислотою. Дезінтегрини блокують IIb/IIIa, заважаючи зв'язуванню фібриногену, і тим самим спричиняють інгібування агрегації тромбоцитів. Крім IIb/IIIa, дезінтегрини можуть зв'язуватися і з іншими інтегринами групи $\beta 1$ і $\beta 3$, такими як рецептори вітронектину ($\alpha V\beta 3$), фібронектину ($\alpha 5\beta 1$), колагену ($\alpha 2\beta 1$) і тромбіну ($\beta 1\alpha$). Таке зв'язування опосередковане Arg-Gly-Asp (або RGD, за однобуквеним позначенням амінокислот) послідовністю у структурі дезінтегринів [19, 36]. До інгібіторів агрегації тромбоцитів, що виявляють свою дію за непрямим механізмом, належать нуклеотидази [31], фосфоліпази A_2 [22], металопротеїнази [28] й оксидази амінокислот [43].

До теперішнього часу описано більше 20 інгібіторів агрегації тромбоцитів із отрути змій роду *Gloydius** (*Agkistrodon*) (табл.1). Такі протеїни або їх рекомбінантні аналоги використовуються як потужні терапевтичні засоби у запобіганні та лікуванні різних видів тромбозів і пухлин, а також як інструмент вивчення процесів взаємодії протеїнів і рецепторів у системі гемостазу. Усе це є підґрунтям для розробки промислових технологій виробництва інгібіторів агрегації тромбоцитів із отрути змій і в подальшому їхніх аналогів для застосування як фармацевтичних засобів. Створення вищезгаданих технологій передбачає отримання кількох цільових протеїнів за один цикл виробництва. Це фактично означає, що в результаті розробки технології за рахунок максимально ефективного використання сировини собівартість продуктів може бути значно знижена. Зважаючи на те, що в країнах Азії (Китай, Індія, Таїланд, В'єтнам) і Південної Америки (Бразилія, Аргентина, Перу, інші) заготовляють сотні кілограмів отрути змій [10, 14, 16, 17, 33, 52, 53], запропонований технологічний підхід зробить продукти, отримані з природної сировини, більш конкурентоздатними за рахунок їх низької собівартості та природного походження, порівняно з рекомбінантними [4].

Таблиця 1. Інгібітори агрегації тромбоцитів із отрути змій роду *Gloydius* (*Agkistrodon*)

Table 1. Platelet aggregation inhibitors of *Gloydius* (*Agkistrodon*) snake venom

Джерело отрути	Назва компонентів	Посилання
<i>Agkistrodon acutus</i>	Трипептид ААР АДФ-аза Фосфоліпаза А ₂ , фібриногенолітик	[13, 20, 24, 35]
<i>Agkistrodon blomhoffii bioe</i>	SV-PP-1 (1235 Да) SV-PP-2 (23339 Да)	[46–47]
<i>Agkistrodon blomhoffii siniticus</i>	Пептид SV-PP-3	[48]
<i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	Applaggin Piscivostatin	[7, 12] [32]
<i>Agkistrodon halys pallas</i>	Інгібітор агрегації тромбоцитів Кисла фосфоліпаза А ₂ 5 мутантних протеїнів – аналогів фосфоліпази А ₂	[27] [45] [28]
<i>Agkistrodon halys</i>	Mamushigin	[38]
<i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>	Fibrolase RGD-F2	[18, 42]
<i>Agkistrodon blomhoffii ussuriensis</i>	Бломус-В Ussuristatin 1 та 2	[3] [34]
<i>Agkistrodon halys brevicaudus</i>	Sal-C Salmosin	[23, 39]
<i>Agkistrodon halys brevicaudus stejneger</i>	r-Adinbitor	[44]
<i>Gloydius saxatilis</i>	Saxatilin	[40, 49]
<i>Gloydius ussuriensis</i>	Gln49-PLA2 Ussurin	[11] [41]
<i>Gloydius halys brevicaudus</i>	Brevicaudin	[15]
<i>Gloydius halys</i>	Ahpfbirase (експресовано в культурі <i>E. coli</i>)	[50]

*Цей рід дуже подібний до щитомордників роду *Agkistrodon*, розповсюджених в Америці, й обидві назви вживалися як синоніми. Але в 90-ті роки щитомордники Азії отримали правильну назву *Gloydius*. У наших попередніх роботах щитомордники були визначені назвою *Agkistrodon*, і ми вдячні австралійським колегам, які звернули нашу увагу на це, оскільки досліджувана нами отрута доставлена зі серпентаріїв Китаю.

Метою нашого дослідження було розробити спосіб очищення та дати характеристику інгібітору агрегації тромбоцитів з отрути *G. blomhoffii brevicaudus*, вміст якого було показано раніше [2].

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

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

У роботі використовували хроматографи серії АКТА (AKTAexplorer, AKTAbasic), оснащені програмою UNICORN 5.01. Хроматографію проводили на сорбентах *Blue Sepharose 6FF*, *Q Sepharose HP* та *Superdex 200 PG*, використовуючи набивні колонки типу ХК або готові до застосування колонки типу HiLoad, HiPrep або HiTrap.

Буфери готували на реактивах, отриманих від Sigma (Німеччина), якістю не нижче 99,5% основної речовини. Кондуктивність і рН розчинів встановлювали у термостабілізованій атмосфері за +20°C на кондуктометрі GLP 31-32 і рН-метрі GLP 21-22 (Crison Instruments SA, Франція).

Об'єм буферів, які використовували у хроматографічному процесі, та об'єм фракцій протеїнів нанесеного зразка виражали в кількості об'ємів хроматографічної колонки (V_c), що використовувалася у кожному конкретному експерименті.

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

Метод подальшого фракціонування на *Q Sepharose HP* описаний раніше [1].

Препаративну хроматографію, що розділяє за розміром, здійснювали на колонці *HiLoad 26/60 Superdex 200 PG* у 20×10⁻³ М імідазол-НCl буфері, рН 7,0, зі швидкістю 1,2 мл×хв⁻¹.

Аналітичну хроматографію здійснювали на колонці *Superdex 75 10/300 GL* (>30000×м⁻¹ теоретичних тарілок).

Склад протеїнових фракцій і молекулярну масу очищених цільових протеїнів визначали електрофоретично на поліакриламідному гелі в умовах денатурації протеїнів (SDS-ПААГ) і мас-спектрометрії. 1D-електрофорез проводили у поліакриламідному гелі 12,5% за методом *Laemmli* [25], використовуючи системи вертикального електрофорезу протеїнів Mini Vertical Unit SE 260 або SE 660 Dual Cooled Vertical Unit. У першому напрямку 2D-електрофорезу ізоелектрофокусування проводили на системі Ettan IPGphor 2 IEF у 7–24 см стрічках з нанесеним градієнтом рН 3,0–10,0. Стрічки регідратували в розчині, що містив IPG Buffer, рН 3–10, протягом 12 годин, наносили зразок і подавали напругу 10 000 V протягом 6–8 годин. Для другого напрямку 2D-електрофорезу стрипи переносили на системи Mini-Vertical Unit SE 250 або Ettan DALTsix Large Vertical System в 10–20% SDS-ПААГ, подавали напругу 3000–4000 V за сили струму 1000–2000 mA. Усі операції проводили за температури 4–6°C, застосовуючи циркуляційний термостат MultiTemp III (все обладнання і реагенти від GE Healthcare AB, Швеція). Стандарти молекулярної маси протеїнів отримували від Fermentas, Литва, та GE Healthcare AB, Швеція.

Візуалізацію протеїнів проводили фарбуванням гелів за допомогою наборів, що включали аргентум нітрат, на станції автоматичного забарвлення електрофограм Processor Plus відповідно до стандартного протоколу.

Молекулярну масу протеїнів визначали на MALDI-TOF Bruker BIFLEX III мас-спектрометрі (BrukerDaltonics, USA) при довжині хвилі лазера 337×10⁻⁶ м. 3,5-Диметокси-4-гідрокси-цинамікову кислоту (синапінова кислота) у вигляді насиченого розчину у воді-ацетонітрилі 3:1 використовували як матрикс. Аліквоти протеїнів (5 мл),

що аналізували, змішували з 5 мл розчину матриксу. Потім 5 мл суміші безпосередньо вприскували в камеру зразків мас-спектрометра і висушували під вакуумом. Для зменшення флуктуації сигналу до суміші додавали 0,1% трифтороцтової кислоти. Інсулін бика (M^+H^+ , 5734,56) і цитохром с коня (M^+H^+ , 12361,09) використовували як зовнішні калібрувальні стандарти. Усі реагенти для мас-спектрометрії отримували від Sigma, Німеччина.

Зразки крові відбирали з вушної вени кролів у пластикову пробірку, змішуючи з 3,8% розчином лимоннокислого натрію у співвідношенні кров:стабілізатор = 9:1. Плазму крові, збагачену тромбоцитами, отримували центрифугуванням крові за 150 g протягом 10 хв при 20°C.

Активність інгібітора агрегації тромбоцитів визначали у збагаченій тромбоцитами плазмі (не довше 3 год зберігання) на агрегометрі AP2110 (Солар, Білорусь) за зниженням агрегації тромбоцитів, індукованої 2,5 мкМ АДФ (Технологія-Стандарт, Росія). Експеримент проводили згідно з інструкцією фірми (Солар, Білорусь).

Фосфоліпазну активність інгібітора агрегації тромбоцитів визначали за розщепленням специфічного флюорогенного субстрату PED-6 (Invitrogen, США) [8].

Вимірювання інтенсивності забарвлення продуктів розщеплення субстратів проводили на спектрофотометрі Ultrospec 3100pro, рідері плашок Biotrak II Visible Plate Reader (GE Healthcare AB, Швеція).

Вміст протеїнів у розчинах визначали за методом Бредфорда [9] за стандартним розчином протеїну відомої концентрації (Fermentas, Литва).

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).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Виробничий вхідний контроль отрути *G. blomhoffii brevicaudus* на цільові протеїни показав наявність інгібіторів агрегації тромбоцитів (IATh) у її складі [2]. Перша стадія процесингу цільної отрути змії афінною хроматографією на *Blue Sepharose 6FF* зареєстрована у міжнародному патенті Center of Excellence НВП Шижир (Монголія) [51]. При застосуванні даного методу для переробки отрути *G. blomhoffii brevicaudus* отримали дві фракції протеїнів, які були здатні інгібувати агрегацію тромбоцитів. Інгібітор агрегації тромбоцитів, що містився в одній із них, одночасно мав фібрин(оген)олітичну активність і описаний нами раніше [6]. У даному дослідженні проводили подальшу розробку технології промислового отримання інгібітора агрегації тромбоцитів із другої фракції протеїнів отрути *G. blomhoffii brevicaudus*, отриманої в результаті першого етапу фракціонування цільної отрути.

Очищення та характеристика інгібітора агрегації тромбоцитів. Нашими попередніми дослідженнями було розроблено підходи для ефективного розділення багатокомпонентних сумішей білків із близькими фізико-хімічними властивостями [5]. Такі підходи є комбінуванням різних хроматографічних методів, які розділяють протеїни за різними фізико-хімічними характеристиками, та підбір оптимальних умов процесів і допомагають очистити декілька навіть дуже схожих цільових компонентів в одному технологічному циклі.

Метод іонообмінної хроматографії (ІОХ) широко застосовується для очищення протеїнів з отрути змії [7, 19, 27, 34, 45] і є найбільш ефективним за умови великих об'ємів зразків та багатокомпонентності білкових фракцій, що характерно для початкових етапів процесингу отрути.

У результаті першого етапу фракціонування цільної отрути було показано, що за використаного рН буфера елюції майже всі цільові протеїни мали від'ємний заряд [5], що давало змогу наносити зразок безпосередньо на колонку з аніонообмінним адсорбентом. Для очищення інгібітора агрегації тромбоцитів нами був застосований сильний аніонообмінний сорбент *Q Sepharose HP*. Підбір оптимальних умов процесу розділення показав, що найкраще розділення протеїнів на *Q Sepharose HP* було за рН 9,1 з однаковою ефективністю у двох буферах: 20×10^{-3} М імідазол-НCl та 20×10^{-3} М трис-НCl [5], що давало нам змогу застосовувати більш дешевий трис-НCl буфер без втрати ефективності виробництва. Функціональні тести показали зниження активності одного із цільових протеїнів за рН 9,1. За використання буферу з рН 8,2 ми отримали задовільне розділення цільових протеїнів і збереження їхньої біологічної активності [5].

У результаті другого етапу хроматографії на *Q Sepharose HP* було отримано ФНБ_{sq} та 10 фракцій (F_1 – F_{10}), які елюювали з колонки градієнтом NaCl [1], з яких ФНБ_{sq} та фракція F_3 були здатні інгібувати агрегацію тромбоцитів. Дослідження на ензиматичні активності у цих фракціях показали, що у фракції F_3 одночасно виявлялася активність фосфоліпази A_2 , а ФНБ_{sq} не мала жодної ензиматичної активності, які визначали при розробці методу.

Такі дані свідчили про те, що отримані інгібітори агрегації тромбоцитів могли бути різними протеїнами. Не виключено, що протеїном із фракції F_3 , який виявляв виражену ІАТh властивість, була саме фосфоліпаза A_2 [45]. У такому випадку очищені ІАТh проявляли би свою дію за різними механізмами, з ФНБ_{sq} – пряму, вірогідно зв'язуючись із тромбоцитами за механізмом дезінтегринів, другий із фракції F_3 – за рахунок непрямої дії фосфоліпази A_2 . Експрес-аналіз на аналітичній колонці з *Superdex 75* [2] показав, що ІАТh-активність як з ФНБ_{sq}, так і з фракції F_3 локалізована в зоні низькомолекулярних протеїнів із масою нижче 14 кДа, що частково підтверджувало наше припущення стосовно природи отриманих інгібіторів, які, за літературними даними, є низькомолекулярними білками [28].

У результаті SDS-ПААГ електрофорезу ФНБ_{sq} протеїн із очікуваною молекулярною масою (10–12 кДа), який виявлявся при хроматографії на аналітичній колонці з *Superdex 75*, у гелі не детектувався, навіть за високочутливої візуалізації нітратом срібла. Натомість були виявлені домішки протеїнів із більшою молекулярною масою (рис. 1). Поясненням такого результату могла бути низька концентрація протеїну, що визначався, у загальній фракції, внесений в електрофоретичний гель, комплексоутворення з високомолекулярними білками, які детектувалися в гелі, або його високий ступінь глікозилювання, що перешкоджав забарвленню протеїну в ПААГ [30, 37].

Оскільки всі домішки у ФНБ_{sq} мали значно більшу молекулярну масу (від 22 до 45 кДа) від очікуваної для цільового протеїну, наступним етапом очищення було застосування хроматографії, що поділяє за розміром.

У результаті хроматографії ФНБ_{sq} на *Superdex 200 PG* було отримано 6 протеїнових фракцій (рис. 2) з орієнтовними молекулярними масами відповідно 45, 36, 25, 18, 10 та 3,5 кДа. Відносний вміст протеїну, розрахований за профілем елюції програмою UNICORN 5.01, у фракціях становив 2,8; 1,4; 9,2; 4,1; 79,3; 3,2%. При цьому протеїн, здатний інгібувати агрегацію тромбоцитів, був виявлений тільки в основній фракції 5. Досліджуваний білок інгібував АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів кроля у плазмі, збагаченій тромбоцитами приблизно на 85%, а за умови попередньої інкубації тромбоцитів із інгібітором досягався його 100% ефект.

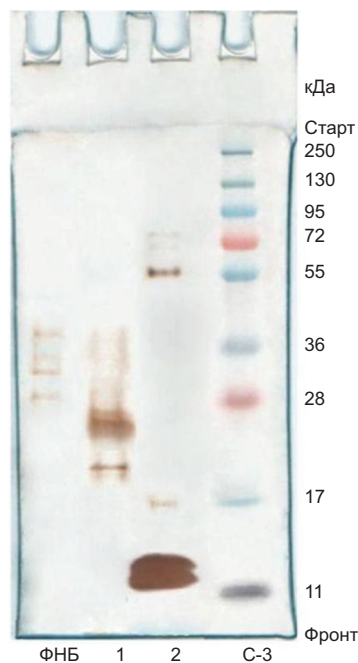


Рис. 1. Електрофореграма SDS-ПААГ білкових фракцій, отриманих у результаті хроматографії на *Q Sepharose HP* ФНБ_{SB}:

С-3 – стандарти молекулярної маси протеїнів; ФНБ – фракція ФНБ_{SO}; 1 – фракція 1; 2 – фракція 2

Fig. 1. SDS-PAAG Electrophoresis of protein fractions obtained after *Q Sepharose HP* chromatographic separation:

C-3 – protein molecular weight standards; ФНБ – fraction of unbound proteins (UB_{OS}); 1 – fraction 1; 2 – fraction 2

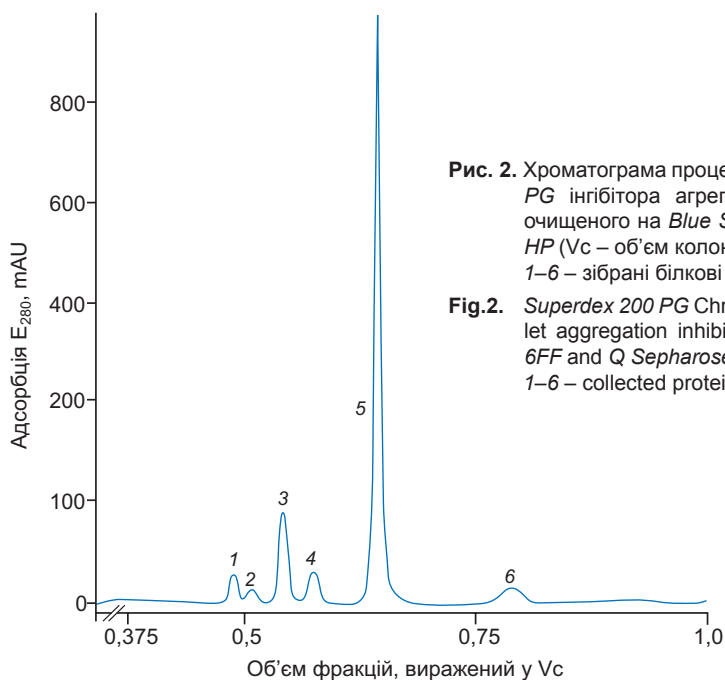


Рис. 2. Хроматограма процесу отримання на *Superdex 200 PG* інгібітора агрегації тромбоцитів, послідовно очищеного на *Blue Sepharose 6FF* та *Q Sepharose HP* (Vc – об'єм колонки):

1–6 – зібрані білкові фракції

Fig.2. *Superdex 200 PG* Chromatography for obtaining platelet aggregation inhibitor purified on *Blue Sepharose 6FF* and *Q Sepharose HP* (Vc – column volume):

1–6 – collected protein fractions

За 2D-електрофорезом загального пулу протеїнів фракції 5 встановлено, що інгібітор агрегації тромбоцитів виділено у гомогенному вигляді (рис. 3) з молекулярною масою 14 кДа та ізоелектричною точкою 8,03. Попередні результати

1D-електрофорезу в умовах, що відновлювали, показали, що цей протеїн є одноланцюговим. MALDI-TOF мас-спектрометрією визначено молекулярну масу досліджуваного протеїну, яка становила 12 001,55 Да.

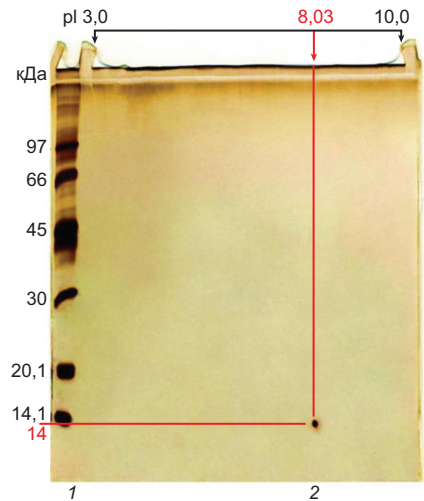


Рис. 3. 2D-електрофореграма інгібітора агрегації тромбоцитів послідовно очищеного на *Blue Sepharose 6FF*, *Q Sepharose HP* і *Superdex 200 PG*

Fig. 3. 2D electrophoresis of platelet aggregation inhibitor consecutively purified on *Blue Sepharose 6FF*, *Q Sepharose HP* and *Superdex 200 PG*

На рис. 4 представлений MALDI TOF мас-спектр очищеного інгібітора агрегації тромбоцитів. Моно-заряджений молекулярний іон $[MH]^+$ та бі-заряджений мономерний іон $[MH_2]^{2+}$ представлені у спектрі. Інтенсивність сигналу димерного монозарядженого $[M_2H]^+$ іона з молекулярною масою 24 000 Да була недостатньою для розрахунку молекулярної маси програмним забезпеченням мас-спектрометра, тому він представлений у спектрі незначним піком. Тривимірний $[M_3H]^+$

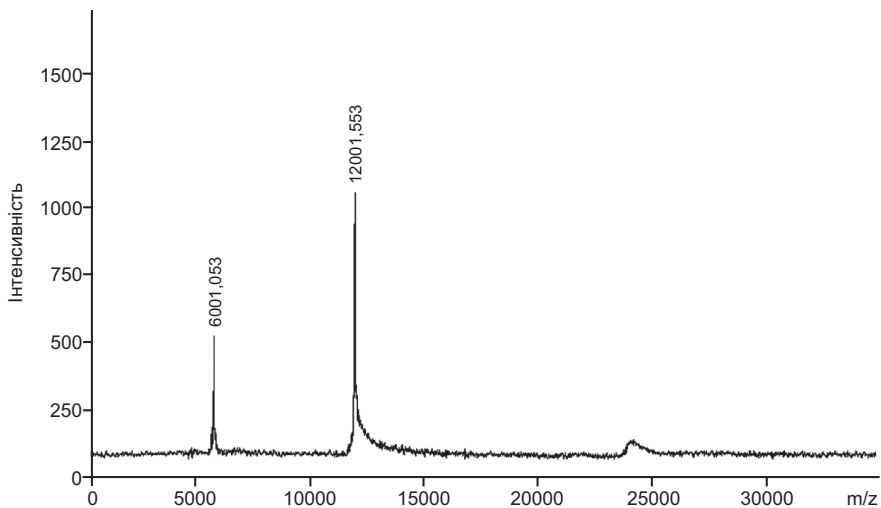


Рис. 4. MALDI-TOF мас-спектрограма інгібітора агрегації тромбоцитів, послідовно очищеного на *Blue Sepharose 6FF*, *Q Sepharose HP* і *Superdex 200 PG*. Визначена молекулярна маса протеїну 12 001,55 Да

Fig.4. MALDI-TOF mass-spectrogram of platelet aggregation inhibitor consecutively purified on *Blue Sepharose 6FF*, *Q Sepharose HP* and *Superdex 200 PG*. Estimated molecular weight is 12 001.55 Da

і тетравимірний $[M_4H]^+$ моно-заряджені іони досліджуваного білка отримані не були, вірогідно внаслідок їх дуже низької інтенсивності. У мас-спектрі домінує сигнал піку масового іона (m/z 12001,55 Да), тоді як сигнал бі-зарядженого іона значно (приблизно у 2 рази) нижчий за інтенсивністю (m/z 6001,053 Да).

Дослідження особливостей біологічної дії інгібітора агрегації тромбоцитів з отрути щитомордника *G. blomhoffii brevicaudus* у плазмі, збагаченій тромбоцитами, показало, що 4×10^{-6} М протеїну, внесеного в інкубаційне середовище, інгібує АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів на 98% (рис. 5). Активність протеїну визначали за показником $ID_{50\%}$ – кількістю інгібітора, яка пригнічує агрегацію тромбоцитів на 50% щодо контролю. $ID_{50\%}$ очищеного інгібітора становив $3,26 \times 10^{-6}$ г або 542×10^{-9} М (рис. 6). Отримані результати збігаються з даними літератури, а це дає нам підстави

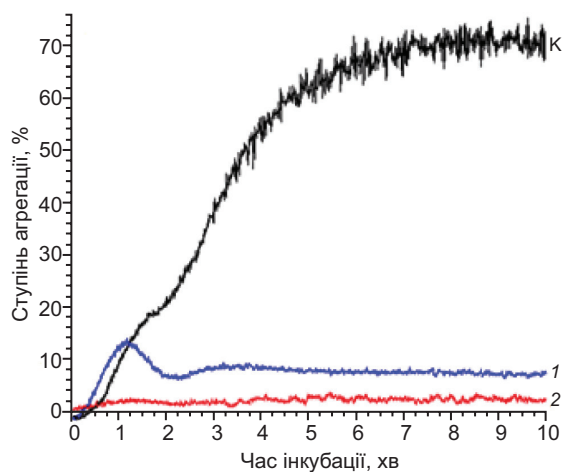


Рис. 5. Агрегограма типового експерименту визначення впливу очищеного протеїну на АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів: 1 – без попередньої інкубації клітин із зразком; 2 – з попередньою інкубацією клітин із зразком; К – контроль

Fig. 5. Aggretogram of a typical experiment: effect of the purified protein on ADP-induced platelet aggregation: 1 – without preliminary incubation of cells with the sample; 2 – with preliminary incubation of cells with the sample; K – control

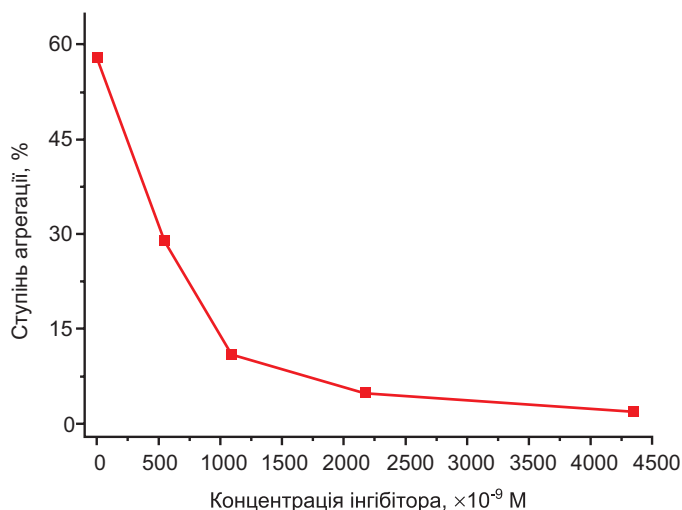


Рис. 6. Дозозалежний ефект інгібування агрегації тромбоцитів протеїном, очищеним з отрути *G. blomhoffii brevicaudus*

Fig. 6. Dose-dependent effect of platelet aggregation inhibition by the protein purified from *G. blomhoffii brevicaudus* venom

вважати, що з отрути *G. blomhoffii brevicaudus* нами виділено і очищено інгібітор агрегації тромбоцитів прямої дії, який за фізико-хімічними характеристиками (способи хроматографічного виділення, поведінка за електрофорезом: молекулярна маса й ізоелектрична точка, одноланцюгова структура) є аналогом Biscivostatin, Contortrostatin і Бломус-В. Незначна різниця в молекулярній масі пояснюється тим, що попередні автори визначали молекулярну масу протеїнів лише за допомогою електрофорезу, що може давати похибку до 5–10%. Застосована нами мас-спектрометрія на сьогодні є найбільш точним методом визначення молекулярної маси білків.

ВИСНОВКИ

Було розроблено технологічний підхід очищення інгібітора агрегації тромбоцитів з отрути *G. blomhoffii brevicaudus*. Даний підхід включав три етапи хроматографічного розділення, що стали частиною єдиного циклу виробництва цільових білків із цільної отрути.

Інгібітор агрегації тромбоцитів отримано у гомогенному вигляді. Показано, що він є одноланцюговий протеїн із молекулярною масою 12 001,55 Да, ізоелектричною точкою 8,03, який інгібував АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів кроля у плазмі збагаченій тромбоцитами з $ID_{50} = 3,26 \times 10^{-6}$ г або 542×10^{-9} М і не виявляв жодної ензиматичної активності.

1. Жукова А. І., Волков Г. Л., Краснобрига Є. М., Гаврилюк С. П. Очищення та характеристика фосфоліпази А2 з отрути *Gloydius blomhoffii brevicaudus*. **Біологічні студії/Studia biologica**, 2012; 6(1): 19–36.
2. Жукова А.І., Краснобрига Є.М., Гаврилюк С.П., Волков Г.Л. Розробка методів ідентифікації цільових білків отрути змії роду *Agkistrodon*. **Медична хімія**, 2011; 13, 3(48): 13–19.
3. Карбовський В. Л., Савчук О. М., Волков Г. Л. та ін. Характеристика інгібітора агрегації тромбоцитів з отрути щитомордника далекосхідного (*Agkistrodon blomhoffii ussuriensis*). **Укр. біохім. журнал**, 2006; 3(78): 130-135.
4. Волков Г.Л., Гаврилюк Е.С. Инновационные технологии в биофармацевтике: модерн и традиции. **Фармацевтическая отрасль**, 2011; 28(5): 94–98.
5. Волков Г.Л., Краснобрыжая Е.Н., Гаврилюк С.П. та ін. Промышленная хроматография белков с близкими физико-химическими свойствами. **Биофармацевт. журнал**, 2009; 1(4): 20–34.
6. Скалка В.В., Краснобрыжая Е.Н., Волков Г.Л. и др. Получение и характеристика фибрино(гено)литического фермента из яда щитомордника рода *Agkistrodon blomhoffii*. **Биофармацевт. журнал**, 2010; 2(2): 32–39.
7. Arni R.K., Padmanabhan K.P., Tulinsky A. Crystallization and preliminary diffraction data of a platelet-aggregation inhibitor from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus* (North American water moccasin). **Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.**, 1999; 55(8): 1468–1470.
8. 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.
9. 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.
10. Burke A. Thailand's islands & beaches. **Lonely Planet Publications Pty Ltd**, 2008: P. 464.
11. Chang Y., Li Y., Bao Y., An L. Neurotoxic activity of Gln49 phospholipase A(2) from *Gloydius ussuriensis* snake venom. **J. Appl. Toxicol**, 2007; 27(5): 447–52.
12. Chao B.H., Jakubowski J.A., Savage B. et al. *Agkistrodon piscivorus piscivorus* platelet aggregation inhibitor: a potent inhibitor of platelet activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 1989; 86(2): 8050–8054.

13. 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.
14. Chopra R.N., Chopra I.C. Indigenous drugs of India. **Academic publishers**, 2006; 3: 691.
15. Deshimaru M., Ichihara M., Hattori T. et al. Primary structure of brevilysin L4, an enzymatically active fragment of a disintegrin precursor from *Gloydus halys brevicaudus* venom. **Toxicon**, 2005; 45(5): 571–580.
16. Dhaka M.K. Bangladesh government plans to export snake venom. squamates.blogspot.com/bangladesh-government-plans-to-export.html – 2010.
17. Donahue J.C., Trump E.K. American zoos during the depression: a new deal for animals. **McFarland&Company Ink**, 2010: 227.
18. Fang H.M., Zhao L., Lu P. et al. Modular design, expression and characterization of novel bifunctional mutants of fibrolase with combined platelet aggregation-inhibition and fibrinolytic activity. **Protein J**, 2011; 30(4): 247–252.
19. Jennings L.K., Phillips D.R. Purification of glycoproteins IIb and III from human platelet plasma membranes and characterization of a calcium-dependent glycoprotein IIb-III complex. **J. Biol. Chem**, 1982; 257: 10458–10466.
20. Jiang W., Ma T., Su X. et al. Enzymatic activities and functional characterization of a novel recombinant snake venom proteinase from *Agkistrodon acutus*. **Biochimie**, 2009; 91(2): 277–287.
21. Kini R.M. Exogenous inhibitors of platelet aggregation from animal sources. **Thrombos. Haemostas**, 2001; 85: 179–181.
22. Kini R.M., Evans H.J. Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. **Toxicon**. 1992, 30: 265–293.
23. Koh Y.S., Kim D.S. Characterization and cDNA cloning of a platelet aggregation inhibitor. **Mol. Cells**, 2000; 10(4): 437–442.
24. Kong Y., Huo J.L., Xu W. et al. A novel anti-platelet aggregation tripeptide from *Agkistrodon acutus* venom: isolation and characterization. **Toxicon**, 2009; 54(2): 103–109.
25. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 1970; 227: 680–685.
26. Lee Y. Snake Venoms. – Handbook of experimental pharmacology. **Sigma Chemical Company**, 1991; 52: 1130.
27. 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.
28. Liu P., Xu J.M., Jin Q. et al. Purification and characterization of platelet aggregation inhibitor component from venom of *Agkistrodon halys pallas*. **J. Exp. Hematol./Chinese Assoc. Pathophysiol**, 2004; 12(2): 194–198.
29. McLane M.A., Sanchez E.E., Wong A. et al. Disintegrins. **Cardiovascular & Haematological Disorders**, 2004; 4: 327–355.
30. Moller H.J., Poulsen J.H. Staining of glycoproteins/proteoglycans in SDS-Gels. The Protein Protocols Handbook. **Humana Press Inc. Ed. J.M. Walker**, 1996: 773–777.
31. Ogawa T., Nakashima K.-I., Nobuhisa I. et al. Accelerated evolution of snake venom phospholipase A₂ isozymes for acquisition of diverse physiological functions. **Toxicon**, 1996; 34(11): 1229–1236.
32. Okuda D., Morita T. Purification and characterization of a new RGD/KGD-containing dimeric disintegrin, Piscivostatin, from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*: The unique effect of Piscivostatin on platelet aggregation. **J. Biochem**, 2001; 130(3): 407–415.
33. O'Shea M. Venomous snakes of the world. **New Holland publishers (UK) Ltd**. 2008, 2: 160.
34. Oshikawa K., Terada S. Ussuristatin 2, a novel KGD-bearing disintegrin from *Agkistrodon ussuriensis* venom. **J. Biochem**, 1999; 125(1): 31–35.

35. Ouyang C., Huang T.F. Platelet aggregation inhibitors from snake venom. **Toxicon**, 1986; 24(11–12): 1099–1106.
36. Proimos G. Platelet Aggregation inhibition with Glycoprotein IIb-IIIa Inhibitors. **J. Thromb. and Thrombolys**, 2001; 11: 99–110.
37. Rexach J.E., Rogers C.J., Yu S.-H. et al. Quantification of O-glycosylation stoichiometry and dynamics using resolvable mass tags. **Nature Chem. Biol**, 2010; 6(9): 645–651.
38. Sakurai Y., Fujimura Y., Kokubo T. et al. The cDNA cloning and molecular characterization of a snake venom platelet glycoprotein Ib-binding protein, mamushigin, from *Agkistrodon halys blomhoffii* venom. **Thromb. Haemost**, 1998; 79(6): 1199–1207.
39. Shin J., Hong S.-Y., Chung K. et al. Solution structure of a novel disintegrin, salmosin, from *Agkistrodon halys* venom. **Biochemistry**, 2003; 42(49): 14408–14415.
40. Sohn Y.D., Hong S.Y., Cho K.S. et al. Acute and repeated dose toxicity studies of recombinant saxatilin, a disintegrin from the Korean snake (*Gloydius saxatilis*). **Toxicon**, 2008; 51(3): 406–417.
41. Sun D.J., Gu H.D., Yang C.W. et al. Molecular cloning and sequence analysis of ussurin, a new metalloproteinases/disintegrin from *Gloydius ussuriensis*. **Chinese J. Biotechnol**, 2003; 19(3): 353–357.
42. Swenson S., Bush L.R., Markland F.S. Chimeric derivative of fibrolase, a fibrinolytic enzyme from southern copperhead venom, possesses inhibitory activity on platelet aggregation. **Arch. Biochem. Biophys**, 2000; 384(2): 227–237.
43. Takatsuka H., Sakurai Y., Yoshioka A. et al. Anticoagulant activity of M-LAO, L-amino acid oxidase purified from *Agkistrodon halys blomhoffii*, through selective inhibition of factor IX. **Biochim. Biophys. Acta**, 2003; 1649: 51–57.
44. Wang J.H., Wu Y., Ren F. et al. Cloning and characterization of Adinbitor, a novel disintegrin from the snake venom of *Agkistrodon halys brevicaudus* stejneger. **Acta Biochim. Biophys. Sin (Shanghai)**, 2004; 36(6): 425–429.
45. 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.
46. Wu S., Li Z., Zhang J. et al. Purification of small peptide from *Agkistrodon blomhoffii* Bioe and its inhibition on platelet aggregation. **J. Chinese Medicinal Materials**, 2004; 27(11): 840–842.
47. Xu W., Wu S., Zhang J. et al. Purification and characteristics of polypeptide with inhibition of platelet aggregation from *Agkistrodon blomhoffii* Bioe. **J. Chinese Medicinal Materials**, 2004; 27(12): 914–915.
48. Xu W., Wu S.Y., Zhang J.J. et al. Purification of a small peptide SV-PP-3 from the venom of *Agkistrodon blomhoffii siniticus* and its inhibition of platelet aggregation. **Acad. J. First Med. College PLA**, 2005; 25(4): 476–478.
49. Young-Doug S., Kil-Sang C., Sae-Ah S. et al. Suppressive effect and mechanism of saxatilin, a disintegrin from Korean snake (*Gloydius saxatilis*), in vascular smooth muscle cells. **Toxicon**, 2008; 52(3): 474–480.
50. Zhang S.T., Lu P., Qin Y.F. et al. Cloning and identification of a novel P-II class snake venom metalloproteinase from *Gloydius halys*. **Appl. Biochem. Biotechnol**, 2010; 162(5): 1391–1402.
51. **WO 2008/020739 Method for extracting α -specific thrombin-like enzyme (Ancistron-B) from *Agkistrodon blomhoffii ussuriensis* venom** / Volkov G., Savchuk A., Karbovskyy V. 2008.
52. Sell-offer snake. [venom/www.aaaoe.com](http://www.aaaoe.com)
53. Snake venom farm in South Australia's Barossa Valley global pharmaceutical. supplier/www.youtube.com

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PLATELET AGGREGATION INHIBITOR FROM THE *GLOYDIUS BLOMHOFFII BREVICAUDUS* VENOM

A. I. Zhukova, G. L. Volkov

Shijir International Co. Ltd., Boroo Valley, Mongolia
e-mail: zhukova0406@gmail.com

Gloydius venom is a rich natural source of proteins possessing platelet aggregation inhibition activity. These proteins or their recombinant analogs are universal instruments for the investigation of proteins and receptors interaction in hemostatic system. At the same time previously studied and potentially new pharmacological properties of platelet aggregation inhibitors from snake venoms create a background for the development of the manufacturing technologies.

This study presents a part of technological development of several target proteins parallel obtaining from *G. blomhoffii brevicaudus* snake venom, in particular development of manufacturing steps for platelet aggregation inhibitor. The target protein was purified using three different chromatographic approaches. It was shown that it is a single chain protein with molecular weight 12001.55 Da, isoelectrical point 8.03, which inhibited platelet aggregation in the rabbit platelet rich plasma with $ID_{50} = 3.26 \times 10^{-6}$ g or 542×10^{-9} M and revealing no enzyme activity.

Keywords: snake venom, *G. blomhoffii brevicaudus*, platelet aggregation inhibitor, protein chromatography.

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ИНГИБИТОРА АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ ИЗ ЯДА *GLOYDIUS BLOMHOFFII BREVICAUDUS*

А. И. Жукова, Г. Л. Волков

Shijir International Co. Ltd., Долина Дождей, Монголия
e-mail: zhukova0406@gmail.com

Яд змей рода *Gloydius* – богатый источник протеинов, способных ингибировать агрегацию тромбоцитов. Такие протеины или их рекомбинантные аналоги являются универсальным инструментом для изучения процессов взаимодействия протеинов и рецепторов в системе гемостаза. Вместе с тем, уже изученные и потенциально новые фармакологические свойства ингибиторов агрегации тромбоцитов из змеиного яда являются онованием для создания технологий их производства.

В данной работе представлена часть технологической разработки параллельного получения нескольких целевых белков из яда *G. blomhoffii brevicaudus*, а именно этапов производства ингибитора агрегации тромбоцитов. Целевой белок был очищен с применением трех различных хроматографических подходов. Показано, что это протеин, состоящий из одной полипептидной цепи с молекулярной массой 12001,55 Да, изоэлектрической точкой 8,03, который ингибировал АДФ-стимулированную агрегацию тромбоцитов кроля в плазме, обогащенной тромбоцитами, с $ID_{50} = 3,26 \times 10^{-6}$ г или 542×10^{-9} М и не проявлял энзиматической активности.

Ключевые слова: яд змей, *G. blomhoffii brevicaudus*, ингибитор агрегации тромбоцитов, хроматография белков.

Одержано: 12.07.2012