

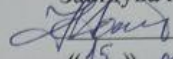
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології

«На правах рукопису»
УДК 606:61

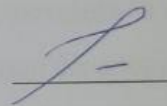
До захисту допущено:

Завідувач кафедри

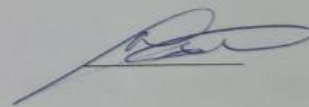
 Наталія ГОЛУБ
«15» травня 2023 р.

Магістерська дисертація
на здобуття ступеня магістра
за освітньо-науковою програмою «Біотехнології»
зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
на тему: «Отримання функціонально активних протеїнів із отрути
Vipera lebetina, *Gloydius halys*»

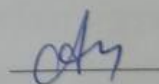
Виконала:
студентка 2 курсу, групи ББ-11 мн
Дмитрук Анна Олександрівна



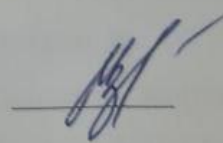
Науковий керівник:
Асистент кафедри біоенергетики,
біоінформатики та екобіотехнології, к. т. н.
Дем'яненко Ірина Володимирівна

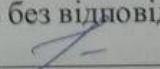


Консультант з розділу: економічна частина
Доцент кафедри економіки і підприємництва, к. е. н., доц.
Погребняк Анна Юріївна



Рецензент:
Доцент кафедри трансляційної медичної біоінженерії,
заступник декана ФБМІ, доктор філософії
Валентина Василівна Мотроненко



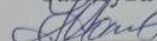
Засвідчую, що у цій магістерській
дисертації немає запозичень з праць
інших авторів без відповідних посилань.
Студентка 

Київ – 2023 року

Національний технічний університет України
 «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
 Факультет біотехнології і біотехніки
 Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології
 Рівень вищої освіти – другий (магістерський)
 Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»
 Освітньо-наукова програма «Біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

 Наталія ГОЛУБ

«23» січня 2023 р.

ЗАВДАННЯ

На магістерську дисертацію студенту
 Дмитрук Анні Олександрівні

1. Тема дисертації «Отримання функціонально активних протеїнів із отрути *Vipera lebetina*, *Gloydius halys*», керівник роботи асистент кафедри біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології, к.т.н. Дем'яненко Ірина Володимирівна, затверджені наказом по університету від «19» квітня 2023 р. № 1534-С

2. Термін подання студентом дисертації 18 травня 2023 р.

3. Об'єкт дослідження: цільна отрута видів змій *Vipera lebetina*, *Gloydius halys*

4. Вихідні дані до дисертації: ліофілізовані отрути *Vipera lebetina*, *Gloydius halys*; **мета** – здійснити хроматографічне отримання фібриногеназ отрути змій *Vipera lebetina* та *Gloydius halys*;, **предмет** - спосіб отримання ферментів з фібриногенолітичною активністю з отрут *Vipera lebetina*, *Gloydius halys*; здатність отриманих ферментів щодо розщеплення фібрину у ензим-електрофорезі.

5. Перелік завдань, які треба зробити: 1. фракціонувати методом хроматографії отрути видів *Vipera lebetina*, *Gloydius halys* на фракції; 2. виявити фракції в отрутах видів *Vipera lebetina*, *Gloydius halys*, здатні подовжувати час зсідання плазми крові в тесті на визначення активованого часткового тромбoplastинового часу; 3. підтвердити наявність та визначити молекулярну масу

ферментів з фібриногенолітичною активністю у отриманих фракціях з отруту змій видів *Vipera lebetina*, *Gloydius halys*; 4. Розробити стартап-проект.

6. Перелік ілюстративного матеріалу (із зазначенням плакатів, презентацій тощо): презентація, 14 слайдів.

7. Орієнтовний перелік публікацій: 1. E. Iskandarov, O. Zinenko, A. Tupikov, A. Pitishkina, O. Platonov, V. Gryshchuk, Y. Kucheriavyi, Y. Stohnii. Action of venom of *Vipera* snake of Ukraine on blood coagulation in vitro: *Biotechnologia Acta*, V. 15, № 2 – 2022, с. 56-57

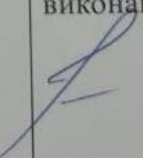
2. Iskandarov E., Dmytruk A. Action of venom of *Vipera lebetina* on blood coagulation in vitro: *Biotechnologia Acta* – 2023

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 4. Стартап-проект	Погребняк А. Ю., доцент кафедри економіки і підприємництва, к. е. н.	01.04.23 	01.05.23 

9. Дата видачі завдання 23 січня 2023 р.

7. Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломної роботи	Термін виконання етапів роботи	Примітка
1.	Літературний огляд	01.10.2022-01.02.2023	виконано 
2.	Фракціонування методом хроматографії отруту видів <i>Vipera lebetina</i> , <i>Gloydius halys</i>	01.02.2023-15.02.2023	виконано 
3.	Виявлення фракцій в отрутах видів <i>Vipera lebetina</i> , <i>Gloydius halys</i> , які здатні подовжувати час зсідання плазми крові в тесті на визначення активованого часткового тромбопластинового часу	16.02.2023-01.03.2023	виконано 
4.	Підтвердити наявність та визначити молекулярну масу ферментів з фібриногенолітичною активністю у отриманих фракціях з отруту змій видів <i>Vipera lebetina</i> , <i>Gloydius halys</i>	01.03.2023-20.03.2023	виконано 

5.	Розробка стартап-проекту	01.04.2023- 01.05.2023	виконано 
6.	Формулювання висновків та оформлення магістерської дисертації	01.05.2023- 10.05.200023	виконано 

Студент



Анна ДМИТРУК

Керівник роботи



Ірина ДЕМ'ЯНЕНКО

РЕФЕРАТ

Магістерська дисертація містить 75 аркушів, 14 рисунків, 20 таблиць та 67 літературних джерел.

Метою роботи було здійснити хроматографічне отримання фібриногеназ отрути змій *Vipera lebetina* та *Gloydius halys*. Предмет досліджень: спосіб отримання ферментів з фібриногенолітичною активністю з отрут *Vipera lebetina*, *Gloydius halys*. Здатність отриманих ферментів щодо розщеплення фібрину у ензим-електрофорезі. Об'єкт досліджень: цільна отрута видів змій *Vipera lebetina*, *Gloydius halys*. Після виконання досліджень, вдалось підтвердити наявність ферментів з фібриногеназною активністю в отрутах *Vipera lebetina* та *Gloydius halys*.

Для отрути *Gloydius halys* спосіб отримання фібриногенази наступний: елюювання незв'язаної фракції з цільної отрути на Blue-sepharose, розділення отриманої фракції на Q-sepharose з отриманням ферменту за концентрації солі 0,3М NaCl та подальшим очищенням даної фракції. Для отрути *Vipera lebetina* таким шляхом відокремити фермент з фібриногенолітичною активністю від інших ефекторів гемостазу не вдалось. Для отримання фібриногенази з отрути *Vipera lebetina* необхідні додаткові етапи очистки.

Перевірка наявності ферментів з фібриногенолітичною активністю проводилась в тесті на визначення активованого часткового тромбопластинового часу. Виявлено фракції в отруті *Gloydius halys*, які подовжували час зсідання плазми крові. Фракція, яка не зв'язується з сорбентом Blue-sepharose, подовжує час зсідання крові у 1,6 разів (в порівнянні з контролем). Після розділення незв'язаної фракції на Q-sepharose, фракція, що елюювалась за концентрації солі 0,3М NaCl, виявляла подовження часу зсідання плазми у 1,9 разів (у порівнянні з контролем). Фракції з отрути *Vipera lebetina*, які отримали після розділення на Q-sepharose, не подовжували час зсідання плазми крові.

Проведення ензим-електрофорезу підтвердило наявність ферменту з фібриногенолітичною активністю у обох отрутах видів *Vipera lebetina*, *Gloydius halys*. Молекулярна маса ензиму склала близько 30 кДа.

Розроблено стартап-проект отримання фібриногенази з отрути *Gloydius halys* шляхом хроматографічного розділення. Технологію можна використовувати для отримання фібриногенази та її подальшого вивчення. Перспективним є створення ліків на основі фібриногенази з отрути *Gloydius halys* для лікування тромбозу.

Робота виконувалась у Відділі структури та функції білку Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України. Під керівництвом наукового співробітника Відділу структури та функції білка, Інститут біохімії ім.О.В.Палладіна, к. б. н. Грищука Володимира Івановича. Висловлюється подяка Грищуку В. І. за допомогу у виконанні досліджень, обробці результатів та оформленні магістерської дисертації.

Ключові слова: фібриногеназа, *Vipera lebetina*, *Gloydius halys*, прямі фібринолітики, білки отрут змій, спосіб фракціонування отрути.

ABSTRACT

The master's dissertation contains 75 sheets, 14 figures, 20 tables and 67 literary sources.

The aim of the work was to carry out chromatographic extraction of fibrinogenases from the venom of snakes *Vipera lebetina* and *Gloydius halys*. The subject of research: the method of obtaining enzymes with fibrinogenolytic activity from the venoms of *Vipera lebetina*, *Gloydius halys*. Ability of the obtained enzymes to split fibrin in enzyme-electrophoresis. The object of research: whole venom of snake species *Vipera lebetina*, *Gloydius halys*. After conducting research, it was possible to confirm the presence of enzymes with fibrinogenase activity in the venoms of *Vipera lebetina* and *Gloydius halys*.

For the venom of *Gloydius halys*, the method of obtaining fibrinogenase is as follows: elution of the unbound fraction from the whole venom on Blue-sepharose, separation of the obtained fraction on Q-sepharose to obtain the enzyme at a salt concentration of 0,3 M NaCl, and further purification of this fraction. For *Vipera lebetina* venom, it was not possible to separate the enzyme with fibrinogenolytic activity from other effectors of hemostasis in this way. To obtain fibrinogenase from the venom of *Vipera lebetina*, additional purification steps are required.

Checking the presence of enzymes with fibrinogenolytic activity was carried out in the test for determining the activated partial thromboplastin time. Fractions in the venom of *Gloydius halys* were identified, which prolonged the clotting time of blood plasma. The fraction that does not bind to the Blue-sepharose sorbent prolongs the blood clotting time by 1,6 times (compared to the control). After separation of the unbound fraction on Q-sepharose, the fraction eluted at a salt concentration of 0,3M NaCl showed a 19-fold increase in plasma settling time (compared to the control). Fractions from *Vipera lebetina* venom obtained after separation on Q-sepharose did not prolong the clotting time of blood plasma.

Enzyme electrophoresis confirmed the presence of an enzyme with fibrinogenolytic activity in both venoms of *Vipera lebetina* and *Gloydius halys* species. The molecular weight of the enzyme was about 30 kDa.

A start-up project for obtaining fibrinogenase from *Gloydius halys* venom by chromatographic separation has been developed. The technology can be used to obtain fibrinogenase and its further study. It is promising to create drugs based on fibrinogenase from the venom of *Gloydius halys* for the treatment of thrombosis.

The work was carried out in the Department of Protein Structure and Function of the Institute of Biochemistry named after O. V. Palladina of the National Academy of Sciences of Ukraine. Under the leadership of a researcher at the Department of Protein Structure and Function, Institute of Biochemistry named after O.V. Palladin, PhD. N. Gryshchuk Volodymyr. We are grateful to V. I. Gryschnik for his help in conducting research, processing results, and preparing the master's thesis.

Key words: fibrinogenase, *Vipera lebetina*, *Gloydius halys*, direct fibrinolytics, snake venom proteins, method of venom fractionation.

Зміст

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ ...	11
ВСТУП.....	12
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	14
1.1 Ферменти в отруті змій.....	14
1.1.1 Фосфоліпази A2	14
1.1.2 Металопротеїнази	15
1.1.3 Серинові протеїнази	16
1.1.4 Оксидази L -амінокислот	17
1.2 Неферментативні антикоагулянти білки	18
1.2.1 Лектин-споріднені білки C-типу	18
1.2.2 Токсини трьох пальців	19
1.3 Характеристика отрути <i>Vipera lebetina</i>	20
1.3.1 Опис змій <i>Vipera lebetina</i>	20
1.3.2 Біологічна активність отрути.....	22
1.4 Склад отрути <i>Gloydius halys</i>	26
1.4.1 Характеристика <i>Gloydius halys</i>	26
1.4.2 Білковий склад отрути <i>Gloydius halys</i>	26
1.5 Висновки до розділу 1	29
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	31
2.1 Матеріали.....	31
2.2 Швидка білкова рідинна хроматографія.....	31
2.3 Тест АЧТЧ.....	34
2.4 Електорофорез.....	35
3. РЕЗУЛЬТАТИ РОБОТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	38

3.1 Отримання ферменту з фібриногенолітичною активністю	38
3.2 Перевірка фібриногенолітичної активності	43
3.3 Висновки до розділу 3	44
4. РОЗРОБКА СТАРТАП-ПРОЕКТУ.....	46
4.1 Резюме: конкретизація бізнес-ідеї, мети стартапу, об'єкту дослідження, місця розробки у інноваційному ланцюжку цінності	46
4.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу	48
4.3 Визначення ключових факторів успіху проекту.....	51
4.4 Визначення категорій потенційних споживачів.....	54
4.5 Ціна реалізації інноваційної технології на ринку	55
4.6 Концепція бізнес-моделі проекту, карта бізнес-процесів реалізації проекту	60
4.7 Ризики стартап-проекту та методи управління ними.....	61
4.8 Висновки до розділу 4	64
ВИСНОВКИ.....	66
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	67

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ

AhV_aPA – кисла фосфоліпаза з отрути *Glodius halys pallas*

CLP - лектинові білки C-типу

FV, FIX, FX, FXIII – фактори зсідання крові

ECM – позаклітинний матрикс

PLA₂ – фосфоліпаза A₂

RVV-X – специфічний активатор фактору X зсідання крові з отрути *Vipera russellii*

MVL-PLA₂ - фосфоліпаза A₂ з отрути *Vipera lebetina*

TLE – тромбіноподібний фермент

VLAIP – дезінтегриноподібна металопротеїназа з отрути *Vipera lebetina*

VLFXA - специфічний активатор фактору X зсідання крові з отрути *Vipera lebetina*

АЧТЧ - активований частковий (парціальний) тромбопластиновий час

ВЕРХ (FPLS)-Високоєфективна рідинна хроматографія

кДНК - комплементарна ДНК

мРНК - матрична рибонуклеїнова кислота

МС – мас-спектрометрія

трис-НСІ – кисла сіль трис (гідроксиметил) амінометана

ВСТУП

За статистикою кожна четверта людина на світі помирає від тромбозу. Тромбоз поділяється на артеріальний та венозний. До артеріального належать ішемічна хвороба серця та ішемічний інсульт. До венозних – тромбоз глибоких вен та емболія легеневої артерії [1].

Останні 50 років у тромболітичній терапії використовуються активатори плазміногену. Але застосування активаторів плазміногену має неминучий ризик кровотечі, найгіршим проявом якої є внутрішньочерепний крововилив, який утворюється в результаті руйнування гемостатичної пробки в місцях пошкодження судин. Активатори плазміногену – непрямі фібринолітики, оскільки руйнують фібринові згустки через активацію плазміногену. На противагу їм існують прямі фібринолітики – вони руйнують фібрин безпосередньо і не викликають кровотечу. До них належать плазмін та його похідні і ферменти з зміїної отрути. Найбільш відомим прикладом є фібролаза та її похідна альфімепраза [2].

Фібролаза - це фібриногенолітичний фермент, виділений з отрути *Agkistrodon contortrix contortrix*. Фібролаза є цинк-вмісною металопротеїназою. Фермент є тромболітичним засобом прямої дії. Фібролаза швидко розщеплює А(α)-ланцюг фібриногену і В(β)-ланцюг з меншою швидкістю; але не має активності в γ -ланцюзі. Рекомбінантна версія ферменту була виготовлена на дріжджах компанією Amgen, Inc. (Таузенд-Оакс, Каліфорнія, США) під назвою альфімепраза. Альфімепразу було взято до клінічних випробувань компанією Nuvelo, Inc. (Сан-Карлос, Каліфорнія), яка ліцензувала фермент від Amgen. Альфімепраза виявилася успішною у клінічних випробуваннях фази I та II щодо оклюзії периферичних артерій та оклюзії пристрою центрального венозного доступу. Однак у випробуваннях III фази альфімепраза не досягла очікуваних кінцевих точок ні в оклюзії периферичних артерій, ні в оклюзії пристрою центрального венозного доступу, а також у випробуванні II фази інсульту, і Nuvelo припинив подальшу розробку в 2008 році [3].

Фібролаза є не єдиною фібриногеназою в отрутах змії. Взагалі, ефектори гемостазу містяться в отрутах різних родів змії. Фібриногенази поділяють на α -

фібриногенази та β -фібриногенази залежно від місця дії [2]. Тому доцільно досліджувати інші види змій на наявність фібриногеназ в отруті та в перспективі розробляти ліки на їх основі.

Мета роботи: здійснити хроматографічне отримання фібриногеназ отрути змій *Vipera lebetina* та *Gloydius halys*.

Завдання:

1. Фракціонувати методом хроматографії отрути видів *Vipera lebetina*, *Gloydius halys*.
2. Виявити фракції в отрутах видів *Vipera lebetina*, *Gloydius halys*, здатні подовжувати час зсідання плазми крові в тесті на визначення активованого часткового тромбопластинового часу.
3. Підтвердити наявність та визначити молекулярну масу ферментів з фібриногенолітичною активністю у отриманих фракціях з отрут змій видів - *Vipera lebetina*, *Gloydius halys*.
4. Розробити стартап-проект.

Наукова новизна: Вперше виділено фермент з фібриногенолітичною активністю з отрут видів *Vipera lebetina*, *Gloydius halys*.

Робота виконана в Інституті біохімії ім. О.В Палладіна Національної академії наук України у Відділі структури та функції білків. Висловлюється подяка співробітникам Відділу структури та функції білків за допомогу в проведенні досліджень та оформленні отриманих результатів.

Апробація:

1. E. Iskandarov, O. Zinenko, A. Tupikov, A. Pitishkina, O. Platonov, V. Gryshchuk, Y. Kucheriavyyi, Y. Stohnii. Action of venom of *Vipera* snake of *Ukraine* on blood coagulation *in vitro*: *Biotechnologia Acta*, V. 15, № 2 – 2022, с. 56-57
2. Iskandarov E., Dmytruk A. Action of venom of *Vipera lebetina* on blood coagulation *in vitro*: *Biotechnologia Acta* – 2023

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Ферменти в отруті змії

Токсини зміїної отрути, що впливають на гемостаз, за загальною дією поділяють на прокоагулянтні та антикоагулянтні. Зміїні отрути містять різні типи білків-антикоагулянтів, деякі з яких мають ферментативну активність, і вони представлені фосфоліпазою A_2 , металопротеїназами, такими як α -фібриногеназа, серинові протеїнази та оксидаза L-амінокислот. Також наявні білки, які не є ферментами, наприклад білки, пов'язані з лектином C-типу та токсини трьох пальців. Зміїні отрути містять ряд серинових і металопротеїназ, включаючи фібрино(geno)літичні ферменти. Тромбіноподібні ферменти і фібриногенолітичні ферменти, які діють на фібриноген, призводять до дефібриногенізації крові і, як наслідок, до зниження в'язкості крові [5].

1.1.1 Фосфоліпази A_2

Ферменти PLA_2 є естеролітичними ферментами, ферментативна дія яких полягає у гідролізі гліцерофосфоліпідів в *sn*-2 положенні гліцеринового скелета, вивільняючи лізофосфоліпіди та жирні кислоти. PLA_2 дуже поширені у зміїних отрутах, декілька сотень цих ферментів вже ідентифікували [6].

Маса PLA_2 складає близько 13 кДа, довжина коливається у межах 116–124 амінокислотних залишків, ферменти зазвичай містять шість-сім дисульфідних зв'язків. Вони інколи глікозилізовані. На сьогодні визначена третинна структура більш ніж 30 PLA_2 . Завдяки цьому визначено, що вони схожі за структурою на ферменти підшлункової залози ссавців і секреторні ферменти PLA_2 . Складаються PLA_2 з ядра з трьох α -спіралей, петлі, яка зв'язує каталітично важливі іони кальцію, та β -крило, утворене з однієї петлі антипаралельного β -шару. С-кінцевий сегмент утворює напівкруглу «перегородку» навколо петлі зв'язування Ca^{2+} [3].

PLA_2 отрути змії є токсичними та викликають широкий спектр фармакологічних ефектів, на відміну від схожих ферментів ссавців. Фармакологічні ефекти включають наступні: нейротоксичний, кардіотоксичний,

міотоксичний, гемолітичний, судомний, антикоагулянтний, антитромбоцитарний, це сприяє набряку і пошкодженню тканин [4].

Серед PLA_2 з отрут змій деякі є інгібіторами зсідання крові. Боффа з колегами класифікували PLA_2 з отрут на сильні, слабкі та неантикоагулянтні ферменти. Для сильних характерне пригнічення згортання при концентраціях навіть нижче 2 мкг/мл, для слабких пригнічення відбувається лише до межі в 3-10 мкг/мл. Головним поясненням антикоагуляційних властивостей цих фосфоліпаз є те, що вони руйнують фосфоліпідні поверхні на коагуляційних комплексах [7].

«Підхід дисекції» використовують для визначення певної стадії коагуляційного каскаду, яка інгібується ферментом PLA_2 . Цей метод визначає вплив антикоагулянту на три найпоширеніші аналізи часу зсідання: протромбіновий час, тромбіновий час. Очевидно, що якщо час зсідання не подовжився під час одного з цих аналізів, значить фермент діє на наступних етапах каскаду коагуляції [2].

Хоча вторинна та третинна структура PLA_2 подібна, властивості як описано вище відрізняються. Для ідентифікації антикоагулянтної області ензимів використовували порівняння амінокислотних послідовностей ферментів з різною коагулянтною силою. Виявлено, що сильніші антикоагулянти більш позитивно заряджені у ділянці 55-67 (амінокислотних залишків) і навіть досліджено, що нейтралізація цього заряду викликає втрату антикоагулянтних властивостей, що доводить прямий зв'язок між зарядом молекул ферменту та антикоагулянтними властивостями.

Крім позитивного заряду, сильним антикоагулянтам з PLA_2 характерна висока проникаюча здатність, збільшення внутрішньої флуоресценції фосфоліпідних везикул при зв'язуванні з ферментами [8].

1.1.2 Металопротеїнази

Металопротеїнази з отрут змій належать до ендопротеолітичних ферментів. На їх каталітичні властивості впливає наявність іонів цинку. За розміром і

структурою ці ферменти поділяють на 4 класи: P-I, P-II, P-III та P-IV. Найпростіші P-I протеїнази містять лише металопротеїназний домен, P-II протеїнази містять 2 домени: металопротеїназний і дезінтегриновий, для P-III протеїназ характерні домени металопротеїназний, дезінтегриновий та багаті цистеїном домени, а P-IV протеїнази містять P-III доменну структуру і домени з лектиноподібною структурою, з'єднані дисульфідними зв'язками [9].

Вже визначено послідовності більше 40 металопротеїназ зміїних отрут. Наявні кристалічні структури для 6 металопротеїназ зміїної отрути (всі з класу P-I). Структура цих ферментів схожа на структуру еластаз і матриксних металопротеїназ. Металопротеїнази зміїних отрут складаються з центрального ядра з β -листа, змішаного з α -спіралями. Між спіралями αD і αE знаходиться характерний залишок метіоніну. Металопротеїнази з отрут змії необхідні для перетравлення здобичі, а також при укусі виявляють геморагічний, прокоагулянтний, антикоагулянтний і антитромбоцитарний ефекти [10].

З металопротеїназ зміїної отрути деякі виступають в ролі інгібіторів зсідання. Більшість металопротеїназ є фібриногеназами і вони вивільняють пептиди з С-кінця фібриногену. Їх поділяють на α - і β -фібриногенази на основі їх специфічності для $A\alpha$ або $B\beta$ ланцюга фібриногену. α -Фібриногенази інгібують зсідання крові, завдяки тому, що частково гідролізований фібриноген не утворює такий міцний фібриновий згусток, як нативний фібриноген. Зв'язок між структурою та антикоагулянтними властивостями металопротеїназ на сьогодні достатньо не вивчений [7].

1.1.3 Серинові протеїнази

Серинові протеїнази зміїної отрути впливають на агрегацію тромбоцитів, зсідання крові, фібриноліз, систему комплементу, артеріальний тиск і нервову систему. Пряма антикоагулянта дія характерна тільки для активаторів протеїну С серед всіх серинових протеаз. Серед серинових протеїназ тільки активатори протеїну С виявляють пряму антикоагулянтну дію. Активатор протеїну С виявлено у отрутах видів роду *Agkistrodon*. Активатор протеїну С - глікопротеїн з

молекулярною масою близько 36–40 кДа. Ферментативну дію виявляє лише при низьких концентраціях солі за відсутності іонів Ca^{2+} . На сьогодні встановлена амінокислотна послідовність тільки активатора протеїну С з отрути *A. contortrix* [11].

Тромбіноподібні ферменти (TLE) також належать до активаторів зсідання та є сериновими протеїназами. Виявлені в кількох родах гадюк (*Agkistrodon*, *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* і *Trimeresurus*), а також у деяких справжніх гадюк (*Bitis* і *Cerastes*) тощо. Тромбіноподібні ферменти – одноланцюгові білки або глікопротеїни з молекулярною масою 26–33 кДа. Вони мають високий ступінь подібності послідовностей між собою ($\approx 67\%$), але менше 40% подібності до людського тромбіну. Активаторна функція тромбіноподібних ферментів пояснюється вивільненням фібринопептидів А або В, зазвичай з різною ефективністю, на відміну від тромбіну. Інгібують тромбіноподібні ферменти класичні інгібітори серинових протеїназ з низькою молекулярною масою, а інгібітори тромбіну (антитромбін III і гірудин) на них не діють. Тромбіноподібні ферменти при впливі на плазму індукують пухкі та напівпрозорі згустки, ймовірно, через відсутність перехресного зшивання фібрину за допомогою FXIIIa. Активація інших факторів зсідання для тромбіноподібних білків не характерна на відміну від тромбіну [6].

Властивості тромбіноподібних ферментів активно використовують в медичній практиці, зокрема створено препарати ancrod (Arvin®; з *Calloselasma rhodostoma*) і батроксобін (Defibrase®; з *Bothrops moojeni*) [12].

1.1.4 Оксидази L -амінокислот

Оксидази L -амінокислот каталізують окислювальне дезамінування ряду L -амінокислот з утворенням пероксиду водню. Вплив оксидаз на систему гемостазу відбувається шляхом модуляції функції тромбоцитів. Sakurai та колеги показали, що оксидаза L -амінокислот, яку отримали з *Agkistrodon halys blomhoffii*, проявляє антикоагулянтну активність. Цей ензим чинить вплив лише на внутрішній шлях,

мало впливаючи на зовнішній шлях. Також вибірково пригнічує активність фактору зсідання FIX [13].

1.2 Неферментативні антикоагулянти білки

До неферментативних білків, які впливають на гемостаз, включають протеїни, в яких така активність не виявлена. Вони здатні напряду взаємодіяти з факторами зсідання і таким чином інгібувати коагуляцію. Розуміння структури цих протеїнів може допомогти в розробці нових антикоагулянтів та поглибити знання в розумінні усього каскаду коагуляції [7].

1.2.1 Лектин-споріднені білки С-типу

Гомодимерні лектини С-типу можуть агглютинувати еритроцити завдяки взаємодії з вуглеводними фрагментами. Білки С-типу, які споріднені з лектином, є гетеродимерами або олігомерними комплексами гетеродимерів та для них не характерні властивості лектину. Інколи вони присутні в отруті змій в комплексі з металопротеїназами. Прокоагулянти білки, зокрема активатор FX з *Daboia russelli* та активатори протромбіну з *Echis carinatus* і *Echis multisquamatus*, мають регуляторні субодиниці, які пов'язані з лектином С-типу. Ці субодиниці є регуляторними і визначають субстратну специфічність [13].

FX і FIX-зв'язувальні білки

З отруту *Deinagkistrodon acutus* і *Trimeresurus stejnegeri* отримали білки, пов'язані з лектином С-типу. Ці протеїни інгібували активацію протромбіну через неферментативний механізм. Атода і Моріта пропустили такий антикоагулянт тільки з отрути *Protobothrops flavoviridis* через FX-афінну колонку. Таким чином було встановлено, що цей протеїн зв'язується з FX/FXa. За своєю структурою, білок був лектиноподібним білком С-типу. Згодом отримали білки, що зв'язуються з FX/FXa, а також з FIX/FIXa з отруту інших видів. Структура ядра цих протеїнів схожа до домену розпізнавання вуглеводів білка, що зв'язує манозу, лектину С-типу. Відмінністю є те, що дані білки мають центральну петлю, яка відходить від основної структури та формує велику петлю [14].

Зв'язок антикоагулянту, що споріднений з лектином С-типу, та факторів зсідання забезпечується наномолярною та субнаномолярною спорідненістю. Пептиди домену γ -карбоксиглутамінової кислоти FX зв'язуються з білком, що споріднений з лектином С-типу за наявності йонів Ca^{2+} з уявними константами дисоціації 1,0 і 100 нМ відповідно. Зв'язування цих факторів зсідання з лектин-спорідненими білками С-типу перешкоджає Ca^{2+} -залежному зв'язуванню FIX і FX з фосфоліпідними мембранами і таким чином сприяє зсуву у бік антикоагуляції [13].

Ботроярацин та ботроальтернін – інгібітори тромбіну та протромбіну

Серед білків, які пов'язані з лектинами С-типу, є такі, що здатні специфічно взаємодіяти з тромбіном та протромбіном. Це ботроярацин та ботроальтернін. З отрути *Bothrops jararaca* отримали білок, який пригнічував агрегацію тромбоцитів під впливом тромбіну, але не під впливом колагену, фактору активації тромбоцитів тощо. Цей білок був названий ботроярацин. Виявлено, що він інгібував також зв'язування α -тромбіну з фібриногеном. Zingali з колегами для перевірки чи інгібує ботроярацин тромбін, чи рецептори тромбіну на тромбоцитах інкубували ботроярацин з тромбоцитами. Після ресуспендування тромбоцитів вже без ботроярацину вони агрегували під впливом тромбіну. Отже, ботроярацин взаємодіє з тромбіном, а не з його рецепторами на поверхні тромбоцитів [15].

Ботроярацин - гетеродимерний білок з міжланцюговим дисульфідним зв'язком. Ланцюги А і В схожі на білки, пов'язані з лектином С-типу. Декілька ізоформ ботроярацину отримали з отрут: *Bothrops jararaca*, *Bothrops atrox*, *Bothrops cotiara*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops neuwiedi* і в малих кількостях в отруті *Lachesis muta*. Також ботроярацин інгібує зворотню активацію фактору коагуляції FV і активацію протромбіну в тромбін [14].

1.2.2 Токсини трьох пальців

До токсинів трьох пальців відносять білки без ферментативної активності розміром 60–74 амінокислотних залишків. Сімейство цих токсинів зустрічається в отрутах Аспідових, Полозових та морських змій. Білки цього сімейства мають

чотири або п'ять дисульфідних містків, які містяться в центральному ядрі та три β -ланцюгові петлі, які відходять від ядра. Завдяки своїй будові це сімейство і отримало таку назву. Біологічна активність токсинів трьох пальців досить різноманітна: α -нейротоксини, κ -бунгаротоксини, мускаринові токсини, фасцікуліни, кальцисептин, кардіотоксини, дендроаспіни і антикоагулянтні білки.

Вперше виявили кардіотоксини трьох пальців з отрути *Naja nigricollis crawshawii*, їм властиві були антикоагулянтний і антитромбоцитарний ефекти [15].

Гемекстин АВ комплекс

Нещодавно в отруті *Hemachatus haemachatus* був виявлений новий антикоагулянтний комплекс. Він складається з двох токсинів трьох пальців: гемекстин А і гемекстин В. Субодиниця гемекстин А має антикоагулянтні властивості, а субодиниця гемекстин В не впливає ніяк на гемостаз. Але гемекстин В утворює комплекс з гемекстином А і синергетично підсилює його антигоагулянтні властивості.

Виявлено інгібування комплексом гемекстин АВ комплексу TF–FVIIa та комплексів FVIIa. Отже, гемекстин АВ - високоспецифічний природний інгібітор ініціації зсідання крові [16].

Інгібітори протеїнази

Також в зміїних отрутах виявлено низку ізоформ інгібіторів серинових протеїназ. Це протеїни довжиною 57-60 амінокислотних залишків, з трьома дисульфідними містками та їх відносять до сімейства панкреатичних інгібіторів трипсину Куніца. Відомо, що всі протеїнази задіяні у зсіданні крові та фібринолізі є сериновими протеїназами, тому білки є потенційними антикоагулянтами. Наприклад, ваприни з отрут змій дуже схожі до елафіну – інгібітора еластази, тому потенційно можуть мати антикоагулянтні властивості [17].

1.3 Характеристика отрути *Vipera lebetina*

1.3.1 Опис змії *Vipera lebetina*

Vipera lebetina (*Macrovipera lebetina*) – вид з роду *Macrovipera*. До цього роду відносять ще три види, всі вони наземні, яйцекладні та отруйні гадюки (Рисунок

1.1) *Vipera lebetina* – змія досить велика (самки досягають довжини 150см), поширена на Кіпрі, в Іраку, Туреччині, Афганістану, Сирії, Лівані, Ірані, Західному Пакистані, Північно-Західній Індії, Йорданії, Вірменії, Азербайджані, Туркменістані, Грузії, Узбекистані, Киргизстані, Казахстані, Таджикистані [16].



Рисунок 1.1 – *Vipera lebetina* в дикому серидовищі. [17]

На сьогодні встановили склад отрути деяких підвидів *Vipera lebetina*: *Macrovipera lebetina obtusa* та *Macrovipera lebetina transmediterranea*. Ідентифіковані білки отрути відносять до двох основних сімейств ферментів та білків, які не є ферментами. До ферментів належать: серинові протеїнази, металопротеїнази, фосфоліпазу A2 та гіалуронідазу. Виявлені протеїни без ферментативної активності: дезінтегрини, лектинові білки С-типу (CLP), натрійуретичні пептиди, міотоксини, токсини CRISP, нервові і судинні ендотеліальні фактори росту, цистатини та інгібітори протеїназ типу Куніца. Цікавим є те, що склад отрути *Macrovipera lebetina obtusa/euphratica* (Туреччина) є багатшим за склад отрути з *Macrovipera lebetina lebetina* (острів Кіпр) ймовірно, через більший ареал та адаптацію до різних середовищ [18].

1.3.2 Біологічна активність отрути

Отрута *Vipera lebetina* – джерело протипухлинних, антибактеріальних та протигрибкових сполук. Підвиди *Vipera lebetina* мають різноманітний склад отрути та своєю антипроліферативною та антимікробною ефективністю проти різних ліній ракових клітин або видів бактерій і грибків. Також цій отруті характерна здатність до пригнічення адгезії окремих клітин меланоми та аденокарциноми товстої кишки до позаклітинного матриксу. Це забезпечується PLA₂, лектиноподібними інгібіторами С-типу та інгібіторами Куніца через інтегрини та рецептори позаклітинного матриксу, які зв'язуються із лігандами позаклітинного матриксу, такими як колагени, для метастазування пухлини та тромбозу [19].

Сполуки з протираковим потенціалом

Фосфоліпаза A₂ з отрути *Vipera lebetina* (MVL-PLA₂) має властивості антиінтегрину ($\alpha 5\beta 1$ і $\alpha v\beta 3$), здатна пригнічувати адгезію та міграцію пухлинних клітин *in vitro*, а також ангіогенез *in vitro* та *in vivo*. Здатність до пригнічення ангіогенезу зумовлена потенціалом цієї фосфоліпази проти інтегрину $\alpha v\beta 3$, який бере участь у ангіогенезі [20].

Наявні свідчення про те, що отруті *Vipera lebetina* властиві антитромбоцитарний ефект, що вона бореться з меланою та раком товстої кишки, завдяки впливу на різноманітні біологічні шляхи. Наприклад, білок Lebein здатен індукувати апоптоз у клітинах меланоми шляхом генерації активних форм кисню і активації каспаз-незалежного апоптотичного шляху. Окрім цього Lebein зменшує проліферацію та збільшує диференціацію клітин меланоми шляхом посилення транскрипційного фактору, пов'язаного з мікрофталмією, шляхом інгібування фосфорилювання позаклітинної сигнально-регульованої кінази. Lebein здатен до підвищення експресії Е-кадгерину, який відповідає за зниження інвазивних властивостей та може знижувати життєздатність клітин раку товстої кишки шляхом індукції як каспазозалежних, так і каспазонеалежних шляхів апоптозу [19].

Також в отруті *Vipera lebetina* виявлено селективний інгібітор інтегрину $\alpha 1\beta 1$ - обустатин. Він обмежує васкуляризацію та зменшує злоякісну саркому

(дослідження проводилось на мишах). Інгібітор інтегрину $\alpha\nu\beta 3$ – лебаргін-С теж виділений з отрути цього виду. Білок дезінтегриноподібний та багатий цистеїном завдяки інігуванню пригнічує клітинну адгезію, також здатен до інгібування інтегринів $\alpha\nu\beta 1$ та $\alpha\nu\beta 6$, але меншою мірою. Отже, лебаргін-С - антиангіогенна сполука. Крім цього лебаргін-С демонструє потенціал антиагрегації тромбоцитів [20].

Лектин-споріднені білки С-типу

В отруті *Vipera lebetina* виявлено лектин-споріднені білки С-типу: лебєцин, лебектин, лебєцетин. Для них характерні протипухлинний та антитромбоцитарний ефекти - наприклад, лебектин знижує агрегацію тромбоцитів завдяки селективному зв'язуванню з тромбоцитами глікопротеїном Ib. Всі три лектини запобігають проліферації, адгезії, міграції та інвазії ракових клітин через інгібування рецепторів адгезії – інтегринів. Лебектин і лебєцетин здатні інгібувати інтегрини, що містять $\alpha 5\beta 1$ і $\alpha\nu$. Для лебектину притаманна антиангіогенна активність *in vitro* та *in vivo* та вибіркоче інгібування активну проліферацію судинних ендотеліальних клітин у хоріоїдальній неоваскуляризації культивованих аортальних і хоріоїдальних експлантів мишей [21].

Лебєцин 2 – білок з отрути *Vipera lebetina* зі схожою структурою до натрійуретичного пептиду В-типу та кардіопротекторного гормону. Відповідно йому властиві кардіопротекторні властивості: стимулює рецептори натрійуретичного пептиду при ішемічно-реперфузійних пошкодженнях в ізольованих серцях щурів, перфузованих Лангендорфом [8].

Інгібітори серинової протеїнази

З отрути *Vipera lebetina* виділено інгібітори серинової протеїнази з сильними протипухлинними властивостями. Вони діють через інтегрини і таким чином зменшують адгезію та міграцію клітин гліобластоми людини. Для них також характерні антиангіогенні властивості, зокрема інгібування адгезії ендотеліальних клітин судин до фібриногену та фібронектину та обмеження їх міграцію через вплив на динаміку мікротрубочок [22].

Металопротейназа, яка індукує апоптоз ендотеліальних клітин

VLAIP – дезінтегриноподібна металопротейназа з цинком типу Р-III індукує апоптоз ендотеліальних клітин. Це гетеродимерний глікопротеїн молекулярною масою близько 106 кДа. Фермент здатний до гідролізу азоказеїну, фібриногену та окисленого В-ланцюгу інсуліну. VLAIP та лебетаза здатні розщеплювати брадикінін в положенні Pro4-Met5. Гідролізує VLAIP ланцюги фібриногену з різною швидкістю: А-ланцюг швидше і В-ланцюг повільніше. Фермент не здатен розщеплювати фібрин [23].

За допомогою рідинної хроматографії в поєднанні з мас-спектрометрією вдалось отримати послідовності з VLAIP, які використали в якості праймерів для клонування кДНК з бібліотеки кДНК отруйної залози *V. lebetina*. Таким чином отримано амінокислотні послідовності двох різних мономерів VLAIP: VLAIP-A і VLAIP-B. кДНК VLAIP-A і VLAIP-B кодують відкриті рамки зчитування довжиною 616 і 614 амінокислотних залишків, в них входять: сигнальний пептид, пропептид та зріла металопротейназа з дезінтегриноподібними та багатими на цистеїн доменами. Мономери VLAIP містять так званий мотив «цистеїнового перемикача» (PKMCGV) у продомені. Він задіяний в активації металопротейнази [24].

Шість залишків цистеїну у металопротейназі формують дисульфідні містки у ланцюгах VLAIP наступним чином: Cys314-Cys394, Cys354-Cys378 і Cys356-Cys361. Залишок Cys369 є вільним та утворює міжланцюговий дисульфідний зв'язок між двома мономерами. Наявність залишку Cys в цій позиції характерно для протеаз, які індукують апоптоз судин, а інші металопротейнази зміїних отрут містять інші амінокислотні залишки в даній позиції [25].

В дезінтегриноподібному домені є мотив ECD, який характерний для більшості металопротейназ типу Р-III. Ділянки мотиву ECD однакові в мономерах VLAIP, вважається, що вони забезпечують зв'язок з інтегринами. Потенційно N-глікозилювання у VLAIP-A здійснюється у одному сайті та у чотирьох у VLAIP-B [24].

VLAIP відносять до сімейства металопротеїназ-дезінтегринів отруту змії та цей фермент гомологічний до інших білків, які індукують апоптоз ендотеліальних клітин. VLAIP здатна до інгібування адгезії ендотеліальних клітин до білків позаклітинного матриксу фібриногену, фібронектину, вітронектину, колагену I та колагену IV. Дана металопротеїназа виступає потужним стимулятором апоптозу в ендотеліальних клітинах судин. VLAIP можна використовувати для досліджень функціонального механізму ендотеліальних клітин судин [13].

Активатор фактору X зсідання крові

В отруті *V. lebetina* знайдено специфічний активатор фактору X зсідання крові – VLFXA. Він розщеплює зв'язок Arg52-Ile53 у важкому ланцюзі фактору X зсідання крові людини. За структурою VLFXA глікопротеїн з трьох ланцюгів: важкого та двох легких, що поєднуються між собою дисульфідними зв'язками. кДНК ферменту кодує 612 амінокислотних залишків, які включають сигнальний пептид, пропептид і зрілу металопротеїназу з дезінтегриноподібними та багатими на цистеїн доменами. Легкі ланцюги VLFXA належать до лектин-споріднених білків С-типу та містять по 123 (LC1) та 135 (LC2) амінокислотних залишків. За допомогою клонування кДНК VLFXA виявлено, що важкі та легкі ланцюги кодуються різними генами. За структурою металопротеїназа VLFXA дуже схожа на металопротеїназу з отрути *V. russellii*, яка теж активує фактор X (RVV-X) [26].

Механізм активації фактору X для активатору з отрути *V. lebetina* ще не з'ясовано, але допускають, що він схожий на активацію RVV-X. В такому випадку у важкого ланцюга має бути металопротеїназна активність, бо він включає три домени, що характерно для металопротеїназ типу РІІІ. Легкі ланцюги LC1 і LC2 нагадують гетеродимерні лектиноподібні білки С-типу і дуже схожі на зв'язуючий білок IX/X. Регуляторна субодиниця з 2 легких ланцюгів зв'язується з Gla-доменом фактора X, а потім каталітична субодиниця з важкого ланцюга розщеплює зв'язок Arg52-Ile53 у важкому ланцюзі фактору X, таким чином вивільняється активний фактор Ха. Отже, легкі ланцюги виступають регуляторними ділянками, які визначають специфічність зв'язування VLFXA з фактором X [13].

1.4 Склад отрути *Gloydius halys*

1.4.1 Характеристика *Gloydius halys*

Gloydius halys — це отруйний вид гадюк, який мешкає в широкому ареалі, що простягається на схід від Уралу аж до Китаю. На сьогодні визнано п'ять підвидів: *G. h. boehmei*, *G. h. caraganus*, *G. h. cognatus*, *G. h. halys*, *G. h. mogoi* [27].

Gloydius halys - змія середнього розміру (Рисунок 1.2) – максимальна довжина становила 59 см для самки та 53 см для самця. Спина гадюки з великими темними плямами чи смугами зигзагоподібної форми, колір – сірий, блідо-коричневий, жовтуватий, червонуватий [28].

Синонімічних назв дуже багато: *Coluber halys*, *Trigonoccephalus halys*, *Halys halys*, *Ancistrodon halys*, *Gloydius halys*, *Agkistrodon halys* [29].



Рисунок 1.2 – *Gloydius halys* в природному середовищі існування [30]

1.4.2 Білковий склад отрути *Gloydius halys*

Більшість протеїнів з отрути *Gloydius halys* є гемотоксинами. Більшість з них беруть участь у гемостатичній регуляції, такі як серинові протеази, фактори зсідання крові, геморагічні токсини, дезінтегрини та інгібітори згортання

фібриногену. У отруті *Gloydius halys* виявлено 13 фосфоліпаз A₂. Отрута *Gloydius halys* містить багато металопротеїназ, які складають більшість протеїнів отути. Молекулярні маси металопротеїназ в більшості випадків складають 30–60 кДа, рІ знаходиться в кислому діапазоні. До складу отрути також входять видоспецифічні білки саксатилін, катроколластатин і мамушигін [31,32].

Кисла фосфоліпаза A₂

В роботі Zhisong Zou зі співавторами було отримано кислу фосфоліпазу з отути *A. halys pallas*, її названо AhV_aPA. Отриманий фермент розщеплює фосфоліпіди яєчного жовтка з ферментативною активністю $6,2 \pm 0,2 \times 10^4$ U/мг. Дана фосфоліпаза має судинозвужувальну дію на кільця грудної аорти мишей. Припускають, що AhV_aPA може впливати на іонні канали або рецептори в плазматичній мембрані гладком'язових клітин судин [33].

Отримували кислу фосфоліпазу AhV_aPA за допомогою триетапної хроматографії: катіонообмінна хроматографія на CM-Sepharose, DEAE-Sepharose аніонообмінна хроматографія, Superdex 75 молекулярно-ексклюзійна хроматографія [34].

Металопротеїназа сальмозин

Dongsu Park з колегами опублікували дослідження отримання нових дезінтегринів з отрути *Agkistrodon halys*. Отримані ферменти містять послідовність Arg-Gly-Asp (RGD) або Lys-Gly-Asp (KGD), що характерно для дезінтегринів [35]. Сальмозин 1 складається з 73 амінокислотних залишків та містить RGD, сальмозин 2 теж з 73 і містить KGD, сальмозин 3 з 80 амінокислотних залишків та містить 7 дисульфідних зв'язків. Показано, що сальмозин інгібує зв'язування інтегрину $\alpha\text{IIb}\beta 3$ з фібриногеном [36, 37].

Металопротеїназа Halysase-A

Геморагічна металопротеїназа була отримана з отрути *Gloydius halys* і названа галізаза [38].

Для отримання ферменту цільну отруту фракціонували з використанням аніонообмінної хроматографії в колонці Q-Sepharose. Отримані фракції аналізували шляхом моніторингу деградації фібриногену та індукції загибелі

ендотеліальних клітин. Подальше очищення проводили гель-фільтрацією з використанням Superdex 75 та аніонообмінної хроматографії Mono-Q. Таким чином отримали фермент галіази з молекулярною масою 66 кДа [39].

За допомогою аналізу ізоелектричного фокусування виявлено, що галіаза є досить кислим білком з pI 4,8. Також встановлено за результатами фарбування PAS, що очищена галіаза є глікопротеїном [40].

З кДНК отримано амінокислотну послідовність галіази. Металопротеїназа має багатофункціональні домени, зокрема пропротеїновий домен, протеїназний домен, дезінтегриноподібний домен і багатий цистеїном домен [41].

Вважається, що дезінтегриноподібний домен галіази відіграє важливу роль у інгібуванні адгезії ендотеліальних клітин до білків ЕСМ або утворення трубок у клітинах. Металопротеїнази зміїної отрути, які складаються з багатофункціональних доменів, індують апоптоз ендотеліальних клітин [42].

Галіаза здатна до гідролізу білків позаклітинного матриксу, зокрема колагену, фібронектину і вітронектину. Ймовірно така субстратна специфічність галіази тісно пов'язана з індукцією апоптозу ендотеліальних клітин. Ферментативна активність галіази індукує апоптоз ендотеліальних клітин шляхом руйнування не лише протеїнів позаклітинного матриксу, але й інтегринів на клітинній поверхні, що призводить до відшарування клітини. Дезінтегриноподібний домен галіази націлює металопротеазу на інтегрини клітинної поверхні. Металопротеазний домен галіази виконує свою каталітичну функцію на відповідних субстратах, включаючи інтегрини та білки позаклітинного матриксу. Послідовність кДНК галіази була депонована в базі даних GenBank під номером доступу AY149647 [43].

Гемокоагулаза

З підвиду *Agkistrodon halys pallas* отримують препарат Bangting®, він є гемокоагулазою. Гемокоагулаза складається з тромбіноподібних ферментів та невеликої частки тромбокіназоподібних ферментів. Препарат широко використовувався в якості кровоспинного засобу. Перевагою гемокоагулази є локалізоване згортання фібриногену, крім системної коагуляції [44].

1.5 Висновки до розділу 1

Отрути змії містять величезну кількість протеїнів з різною структурою та функціями. Багато з яких здатні впливати на гемостаз: активувати або навпаки інгібувати фактори зсідання крові, руйнувати ендотелій. За цим принципом можна поділити зміїні токсини на прокоагулянтні та антикоагулянтні. За механізмом дії ці протеїни поділяють на ферменти та білки без ферментативної активності.

Ферменти PLA₂ є естеролітичними ферментами, ферментативна дія яких полягає у гідролізі гліцерофосфоліпідів в *sn*-2 положенні гліцеринового скелета, вивільняючи лізофосфоліпіди та жирні кислоти. Фармакологічні ефекти PLA₂ включають наступні: нейротоксичний, кардіотоксичний, міотоксичний, гемолітичний, судомний, антикоагулянтний, антитромбоцитарний, які сприяють набряку і пошкодженню тканин. Металопротеїнази з отрути змії належать до ендопроотеолітичних ферментів. За розміром і структурою ці ферменти поділяють на 4 класи: PI, P-II, P-III та P-IV. Серинові протеїнази зміїної отрути впливають на агрегацію тромбоцитів, зсідання крові, фібриноліз, систему комплементу, артеріальний тиск і нервову систему. Оксидази L-амінокислот каталізують окислювальне дезамінування ряду L-амінокислот з утворенням пероксиду водню. Вплив оксидаз на систему гемостазу відбувається шляхом модуляції функції тромбоцитів.

Білки без ферментативної активності сповільнюють зсідання крові шляхом прямої взаємодії з факторами зсідання. Трипальчасті токсини були знайдені в отруті *Naja nigricollis crawshawii* мають атикоагулянтний і антитромбоцитарний ефекти. Інгібітори серинових протеаз такою виявляють антикоагулянтні властивості, оскільки всі протеїнази, які беруть участь у каскаді зсідання крові, є сериновими. Текстиліни з отрути *Pseudonaja textilis textilis* досліджують як інгібітори плазміну та на антифібринолітичну активність.

Лектини С-типу аглютинують еритроцити завдяки взаємодії з вуглеводними фрагментами.

Vipera lebetina (*Macrovipera lebetina*) – вид з роду *Macrovipera*. На сьогодні встановили склад отрут деяких підвидів *Vipera lebetina*: *Macrovipera lebetina obtusa*

та *Macrovipera lebetina transmediterranea*. Ідентифіковані білки отрути відносять до двох основних сімейств ферментів та білків, які не є ферментами. До ферментів належать: серинові протеїнази, металопротеїнази, фосфоліпаза А₂. Виявлені протеїни без ферментативної активності: дезінтегрини, лектинові білки С-типу, натрійуретичні пептиди, міотоксини, токсини CRISP, нервові і судинні ендотеліальні фактори росту, цистатини та інгібітори протеїназ типу Куніца.

Gloydius halys — це отруйний вид гадюк, який мешкає в широкому ареалі, що простягається на схід від Уралу аж до Китаю. Більшість протеїнів з отрути *Gloydius halys* є гемотоксинами. Більшість з них беруть участь у гемостатичній регуляції, таких як серинові протеїнази, фактори зсідання крові, геморагічні токсини, дезінтегрини та інгібітори згортання фібриногену. У отруті *Gloydius halys* виявлено 13 фосфоліпаз А₂. Отрута *Gloydius halys* містить багато металопротеїназ, які складають більшість протеїнів отрути. Молекулярні маси металопротеїназ в більшості випадків складають 30–60 кДа, рІ знаходиться в кислому діапазоні. До складу отрути також входять видоспецифічні білки саксатилін, катроколластатин і мамушигін.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріали

У роботі було використано такі матеріали та реактиви: акриламід, біс-акриламід, маркери молекулярної маси для електрофорезу (Fermentas, Європейський союз); трис-НCl, натрій додецисульфат (Bio-Rad Laboratories), Q- Sepharose, («Pharmacia», Швеція), Blue-Sepharose, («Pharmacia», Швеція). Решта використаних реактивів – вітчизняного виробництва категорії х.ч.

2.2 Швидка білкова рідинна хроматографія

Першим етапом для фракціонування отрут досліджуваних змій була швидка білкова рідинна хроматографія (FPLC). Це один з видів рідинної хроматографії, який часто застосовують для аналізу білкових сумішей [51]. Поділ відбувається завдяки різним властивостям компонентів суміші до адсорбції у нерухомій фазі. Рухомою фазою зазвичай виступає буферний розчин, нерухомою – смола, яка складається зазвичай з частинок зшитого агарози, які заповнюють колонку. Розрізняють ізократичний та градієнтний режими елювання. Під час ізократичного склад рухомої фази залишається незмінним, під час градієнтного змінюється [52].

FPLC-система складається з наступних компонентів:

1. Інжекційної петлі, куди подається проба об'ємом від кількох мкл до десятків мілілітрів.
2. Інжекційний клапан, який з'єднує інжекційну петлю зі змішувачем.
3. Насос, їх зазвичай два, вони двоциліндрові поршневі. Забезпечують змішування рухомих фаз і подають їх на колонку.
4. Хроматографічна колонка – скляна або пластикова циліндрична трубка заповнена сорбентом, в якому і відбувається розподіл.
5. Проточна кювета (одна або декілька) слугує для вимірювання концентрації білка в елюенті (поглинання УФ-випромінювання на довжині

хвилі 280 нм). Також є датчик провідності, який вимірює концентрацію солі в елюєнті.

6. Візуалізація отриманих результатів відбувається шляхом побудови профілей елюцій (хроматограм) завдяки комп'ютерному забезпеченню або реєстратору діаграм.

7. Отримані фракції елюенту можуть після аналізу збирати у колектор фракцій для подальшого дослідження [53].

Серцем хроматографа і найважливішим компонентом є колонка, заповнена нерухомою фазою. Сорбенти розділяють суміші білків на основі розміру молекул (гель-фільтрація), їх заряду (іонообмінна хроматографія), гідрофобності(гідрофобна взаємодія) або ж наявності певних лігандів (афінна хроматографія). Зазвичай розподіл відбувається за декількома властивостями [54].

Іонообмінна хроматографія дозволяє розділяти іонізовані молекули на основі відмінностей їх зарядів. Її широке застосування (особливо до білків і ферментів), помірна вартість, потужна роздільна здатність та простота масштабування та автоматизації привели до того, що вона стала одним із найбільш універсальних і широко використовуваних серед усіх рідинних хроматографій методом.

Подібно до інших форм рідинних хроматографій (наприклад, гель-фільтрації, афінної, гідрофобної), ця методика включає як рухому, так і нерухому фази, перша зазвичай водна буферна система, в яку вводиться суміш, яку потрібно розділити, і остання зазвичай є інертною органічною матрицею, хімічно дериватизованою іонізованими функціональними групами [55].

Серед тисяч різних сорбентів є деякі, які гарно зарекомендували себе для розподілу змішаних отрут. В роботі використовувалась Q-сефароза та blue-сефароза. Q-сефароза – аніонообмінна смола, складається з поперечно зшитих 6% агарозних кульок, у яких кожна стінка пори покрита сильними катіонами четвертинного амонію (Q) (Рисунок 2.1). Таким чином білки з негативним зарядом зв'язуються і залишаються у порах сорбенту, а інші елюються далі [55]. Для фракціонування отрути було використано Q-сефарозу, зрівноважену 0,05 М трис-HCl буфером, рН

8,9. Об'єм колонки становив 12,5 мл, швидкість потоку 1 мл/хв. Сорбовані протеїни елюювали тим же буфером із ступінчастим градієнтом 0,1; 0,2; 0,5 та 2 М NaCl, рН 8,9.

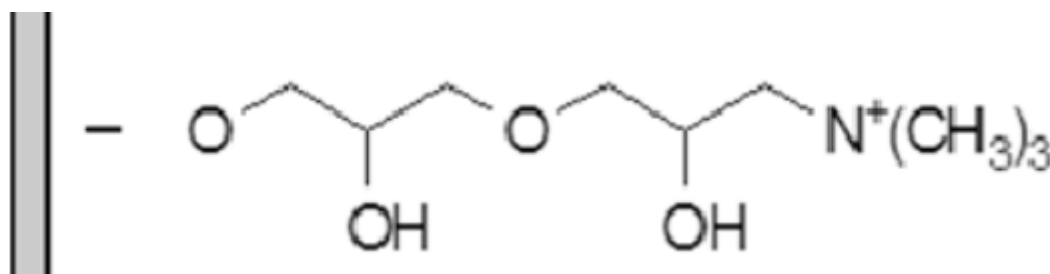


Рисунок 2.1 – Структурна формула ліганду Q-сефарози [56]

Іншим сорбентом, який використовувався в роботі є Blue-сефароза. Це афінна хроматографічна смола, яка складається з 6% агарозних кульок модифікованих Cibacron Blue 3G (приєднаний шляхом триазинового сполучення) (Рисунок 2.2) [57] Cibacron Blue 3G зв'язує різні білки, зокрема альбумін, інтерферон, ліпопротеїни, фактори згортання крові та ферменти (кінази, дегідрогенази та ті ензими, в яких кофактори містять аденіл) [58].

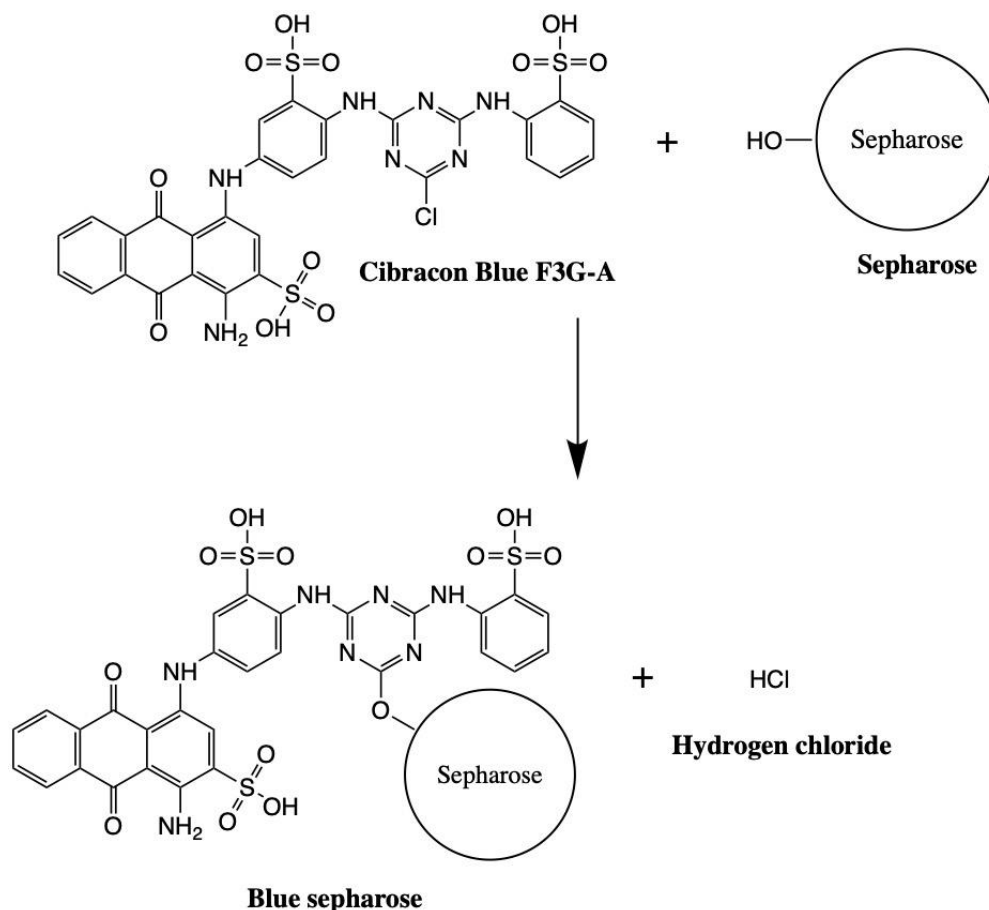


Рисунок 2.2 – Схема отримання сорбенту Blue-сефароза [59]

Концентрацію протеїнів визначали спектрофотометрично за допомогою спектрофотометра Optizen-POP (Корея). за рахунок здатності протеїнів поглинати в УФ-спектрі. Вимірювали поглинання при довжині хвилі 280 нм, віднімаючи значення поглинання за 320 нм. Концентрацію протеїнів визначали формулою: $C = E / \epsilon l$, де C – концентрація протеїну, моль/л, ϵ - коефіцієнт молярної екстинкції; l – довжина оптичного шляху, см. Для визначення концентрації фібриногену використовували значення коефіцієнту молярної екстинкції 15,067. В окремих випадках концентрацію протеїнів визначали за методом Бредфорда [60].

2.3 Тест АЧТЧ

Визначення активованого часткового тромбопластинового часу (АЧТЧ) – це метод дослідження, який використовується не тільки в наукових цілях, а в повсякденній діагностиці. Визначення АЧТЧ використовується в діагностиці

системи гемостазу, а саме для виявлення гіпер- і гіпокоагуляційного зсуву, контролю за гепаринотерапією при тромбозах, тромбоемболіях, для діагностики гемофілії (дефіцит факторів VIII, IX, XI), хворобі Віллебранда [60, 61].

Суть дослідження полягає у визначенні часу згортання плазми при додаванні до неї розчину кальцій хлориду. В даному дослідженні до зразків плазми додавались отримані фракції після хроматографії та отримані значення часу порівнювались зі контрольним зразком. Скорочення АЧТЧ свідчить про зсув гемостазу у бік коагуляції, а подовження відповідно про збільшення часу коагуляції [62].

2.4 Електрофорез

Найпоширенішим електрофоретичним розділенням білків є метод з використанням поліакриламідного гелю. Складається гель з акриламідом та метиленбісакриламідом, перший утворює лінійні полімери, а другий зшивки між ними. Перевагою поліакриламідного гелю є більш контрольований розмір пор та полімеризація відбувається навіть при використанні достатньо агресивних буферів [63]. Стандартно використовують лідоючий барвник для спостереження за рухом електрофоретичного фронту під час аналізу. Після аналізу електрофоретичну пластину фіксують у розчині органічних розчинників (ізопропанол/оцтова кислота/етанол) та забарвлюють кумасі синім для візуалізації отриманого розподілу білків [64].

Склад поліакриламідного гелю може змінюватись якісно та кількісно. Співвідношення акриламід/бісакриламід дуже варіює. Також додають інші компоненти: лаурилсульфат натрію для електрофорезу у денатуруючих умовах, субстрат для ензим-електрофорезу тощо. Під час проведення електрофорезу у системі Лемлі використовують тріс-гліциновий буфер з рН 9,8. Розмір пор у гелі впливає на його розподільчі властивості, тому часто використовують створення у пластині двох гелів одночасно: концентруючого та розподільчого [65].

Електрофорез у поліакриламідному гелі в присутності натрій додецилсульфату був проведений за методом Лемлі, в ньому використали трис-гліцинову систему на приладі для вертикального гель-електрофорезу у пластинках.

Зразки для електрофорезу готували за наступним алгоритмом: до розчину білка з концентрацією 1 мг/мл додавали буфер для зразків, що містив 5 % сахарозу або гліцерин, 2 % натрій додецилсульфат та бромфенол до появи забарвлення.

Розділення було проведено при електричному струмі 19 мА для концентруючого гелю і 36 мА для розподільного.

Проявлення пластинки гелю для виявлення ділянок, що містять білки, проводили забарвленням у розчині (0,125 % Кумассі G-250 в 25% ізопропанолі та 10% оцтової кислоти) протягом 10 хвилин. Для видалення залишків барвника використовували 3-9 % розчин оцтової кислоти. Роздільна здатність методу 1 мкг протеїну.

Для встановлення молекулярної маси протеїнів, що досліджуються використовували молекулярні маркери (Fermentas, Європейський союз): № SM0671.

Ензим-електрофорез – один з варіантів звичайного електрофорезу у системі Лемлі, де до гелю додають потенційний субстрат для аналізованого ферменту. Після електрофорезу пластину інкубують у буфері за умов що є оптимальними для дії ферменту [66, 67].

Ензим-електрофорез проводили за методом Лемлі у 15 % ПААГ. У розділяючий гель перед полімеризацією вносили 0,5 мг/мл фібриногену. Після електрофорезу натрій додецилсульфат видаляли з гелю триразовим відмиванням у 2,5 % розчині тритону X-100 протягом 30 хв. Інкубували гель у 0,1 М гліциновому буфері, рН 8,3 протягом 12 год. Гель забарвлювали Кумассі G-250 та ідентифікували зони протеолітичної активності за розташуванням незабарвлених плям на гелі

Статистичний аналіз даних проводився за допомогою програми з пакету Microsoft, а саме Microsoft Excel. Всі аналізи були проведені у серії з трьох повторів, при обробленні даних було враховано стандартне відхилення.

2.5 Висновки до розділу 2

Для ідентифікації та біохімічної характеристики білків зміїних отрут використовують різноманітні аналітичні методи. Для отримання ферментів з отрут *Glodius halys* і *Vipera lebetina* обрано ВЕРХ. Це вид рідинної хроматографії, який дозволяє розділяти суміші білків. В якості сорбентів було обрано Q-sepharose і Blue-sepharose. Обидва сорбенти складаються з агарозних кульок. У випадку Q-sepharose до кульок приєднаний ліганд $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, тому він є аніонообмінником. Blue-sepharose модифікована лігандом Cibacron Blue 3G). Cibacron Blue 3G зв'язує різні білки, зокрема фактори зсідання крові та ферменти (кінази, дегідрогенази та ті ензими, в яких кофактори містять аденіл).

Для перевірки здатності отриманих фракцій до впливу на час зсідання крові обрано тест на визначення активованого часткового тромбопластинового часу (АЧТЧ). Методика є відносно не складною та швидкою, суть полягає у вимірюванні часу утворювання фібринового згустку після додавання до плазми хлориду кальцію. Якщо після додавання до плазми фракцій, отриманих після хроматографічного розділення, час подовжиться, то це свідчить про ймовірний вміст ферменту з фібриногенолітичною активністю.

Для перевірки фібриногенолітичної активності необхідне підтвердження, що фермент взаємодіє саме з фібрином, а не з іншими компонентами зсідання крові. Для цього був обраний ензим-електрофорез. Це модифікація електрофорезу у поліакриламідному гелі, де в якості субстрату доданий фібрин. Для визначення маси ідентифікованого фермента з фібриногенолітичною активністю ставився також звичайний електрофорез в поліакриламідному гелі, де порівнювався аналізована фракція з маркерами.

3. РЕЗУЛЬТАТИ РОБОТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Робота виконувалась у Відділі структури та функції білку Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України. Під керівництвом наукового співробітника Відділу структури та функції білка, Інститут біохімії ім.О.В.Палладіна, к. б. н. Грищука Володимира Івановича. Висловлюється подяка Грищуку В. І. за допомогу у виконанні досліджень, обробці результатів та оформленні магістерської дисертації.

3.1 Отримання ферменту з фібриногенолітичною активністю

Ліофілізовану цільну отруту *G. halys* розчинили у дистильованій воді (концентрація 100 мг/мл). Зразок аналізували з використанням FPLC-системи АКТА Prime. Хроматографічна колонка з сорбеном Blue-sepharose, рухома фаза – 0,05 М тріс-НСІ буфер зі змінною концентрацією солі NaCl (від 0 до 2 М). Зміна концентрації солі відбувалась після виходу фракції (спостерігали за профілем елюції) за наступною схемою: без солі (вихід незв'язаної фракції), 0,7 М та 2 М NaCl відповідно.

На рисунку 3.1 представлено хроматограму цільної отрути *G. halys* на Blue-sepharose.

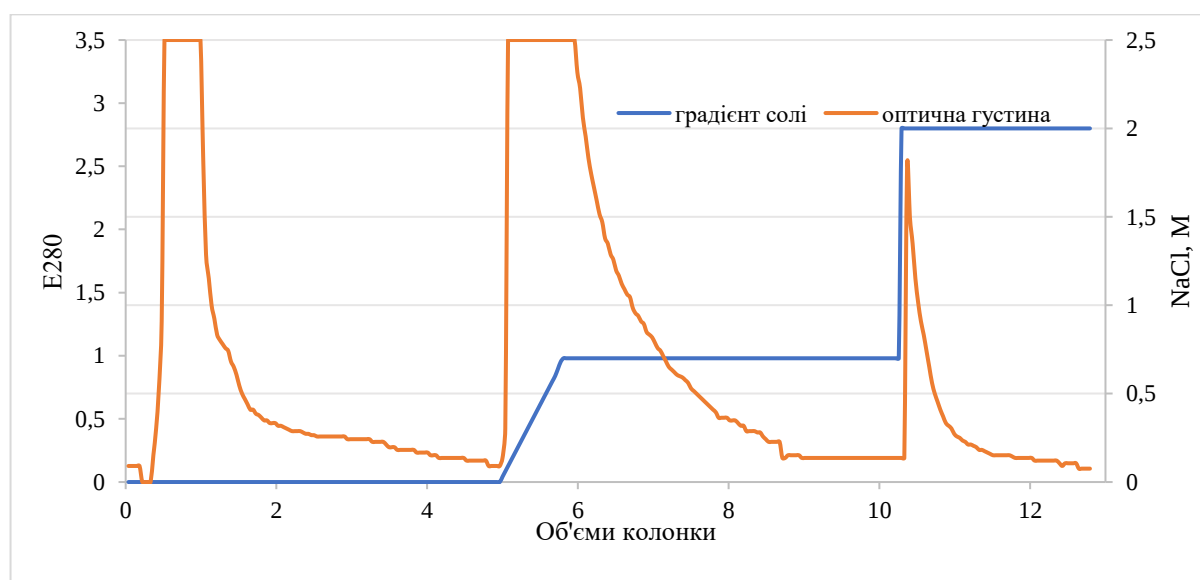


Рисунок 3.1 – Хроматограма цільної отрути *Gloydius halys* на Blue-sepharose

Отримані фракції було знесолено та сконцентровано з використанням центрифужних мікроконцентраторів Amicon Ultra 3K.

Далі отримані фракції перевіряли на час утворення фібринового згустку з використанням тесту АЧТЧ.

Для цього 80 мкл плазми крові інгібували з 20 мкл фракції у кінцевій кількості 0,05 о.о./мл (або з еквівалентною кількістю буферу) протягом 3 хв, після цього зсідання ініціювали внесенням 100 мкл 0,025 М розчину CaCl_2 та 100 мкл розчину АДФ. У якості контролю додавали буфер замість досліджуваних зразків.

Час зсідання був наступним: 42с (контроль), 68с (незв'язана фракція), 41с (0,7 М NaCl), 44с (2 М NaCl). Аналіз показав подовжений час зсідання у незв'язаній фракції в порівнянні з контролем (Рисунок 3.2)

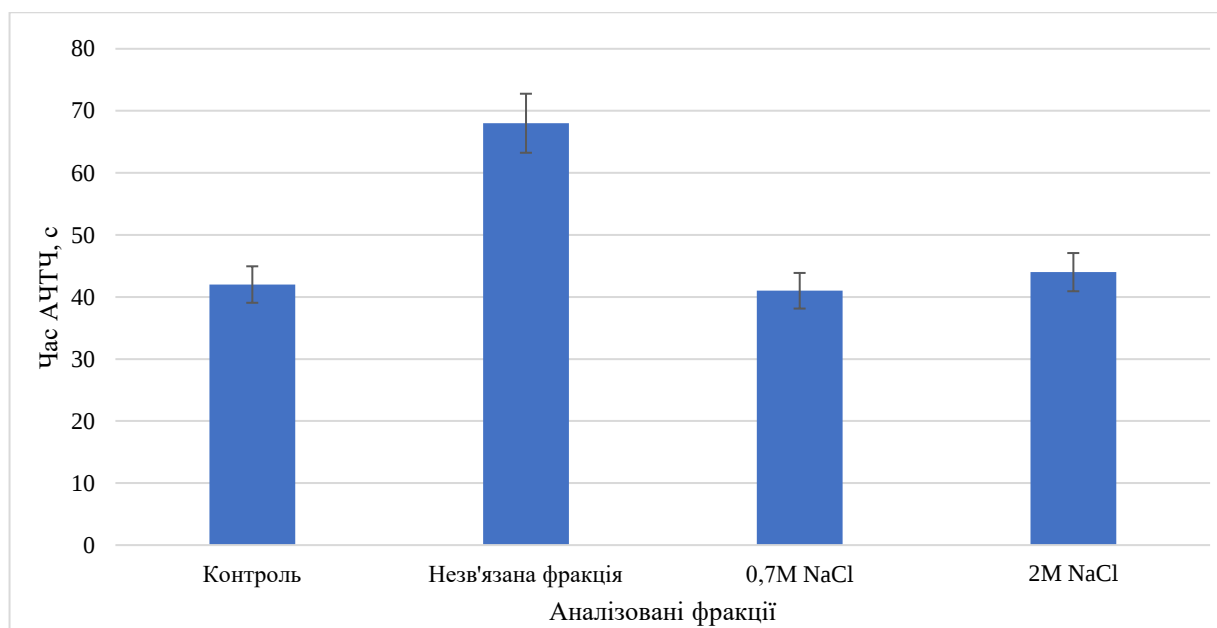


Рисунок 3.2 – Тест АЧТЧ отриманих фракцій після розділення цільної отрути *G. halys* на blue-Sepharose

Таким чином після початкового етапу аналізу отрути змії *G. halys* функціональним тестом АЧТЧ на вплив на систему гемостазу було з'ясовано, що незв'язана фракція мала різноманітні властивості, що дало підставу для більш глибокого дослідження складу цієї фракції.

Незв'язану фракцію, яка потенційно містила фібриногеназу, розділили з використанням FPLC-системи AKTA Prime. Хроматографічна колонка з сорбеном Q-sepharose, швидкість потоку 4мл/хв, рухома фаза – 0,05 М тріс-НСІ буфер зі змінною концентрацією солі NaCl (від 0 до 1 М). Зміна концентрації солі відбувалась за наступною схемою: 0 М (вихід незв'язаної фракції), 0,08 М, 0,12М, 0,3М та 0,7М (Рисунок 3.3).

Отримані фракції було знесолено та сконцентровано з використанням центрифужних мікроконцентраторів Amicon Ultra 3К. Для характеристики протеїнового складу фракцій було використано гель-електрофорез у системі Лемлі.

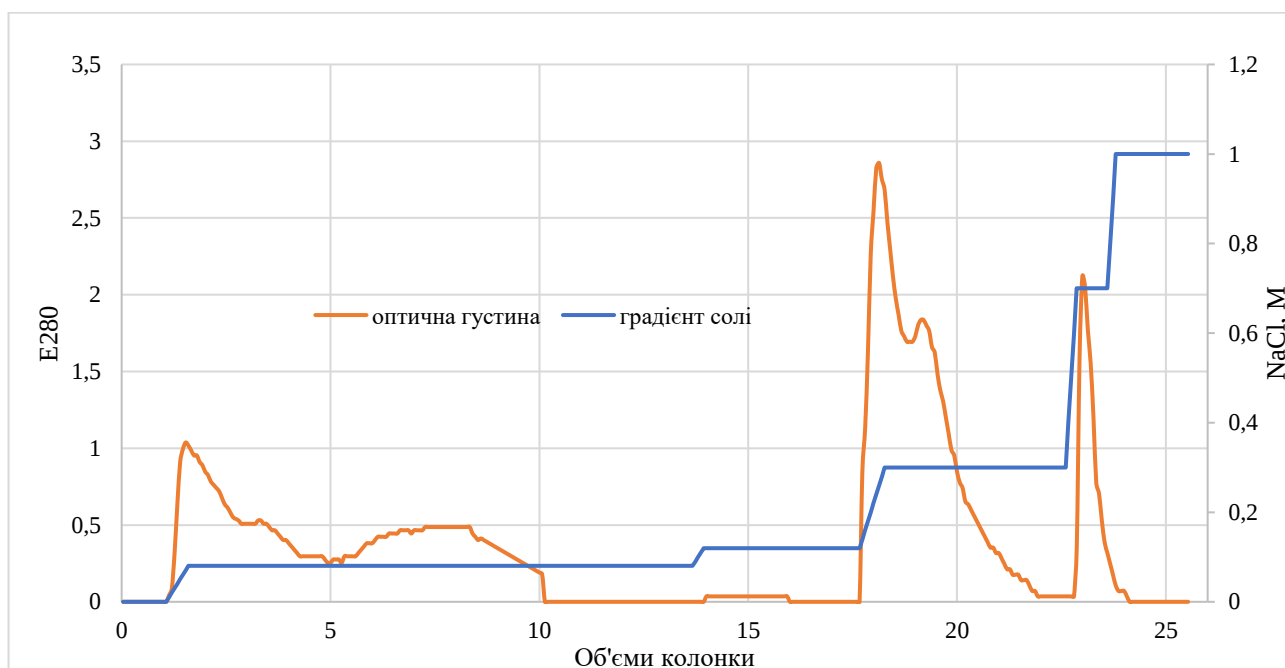


Рисунок 3.3 – Хроматограма незв'язаної фракції отрути *G. halys* на Q-sepharose

Далі так само отримані фракції перевіряли на час утворення фібринового згустку з використанням тесту АЧТЧ. Час зсідання був наступним: 42с (контроль), 41с (незв'язана фракція), 43с (0,08 М NaCl), 42с (0,12 М NaCl), 84 (0,3 М NaCl), 44с (0,7 М NaCl). Аналіз показав подовжений час зсідання у фракції, яка елюювалась при концентрації 0,3М NaCl в порівнянні з контролем (Рисунок 3.4)

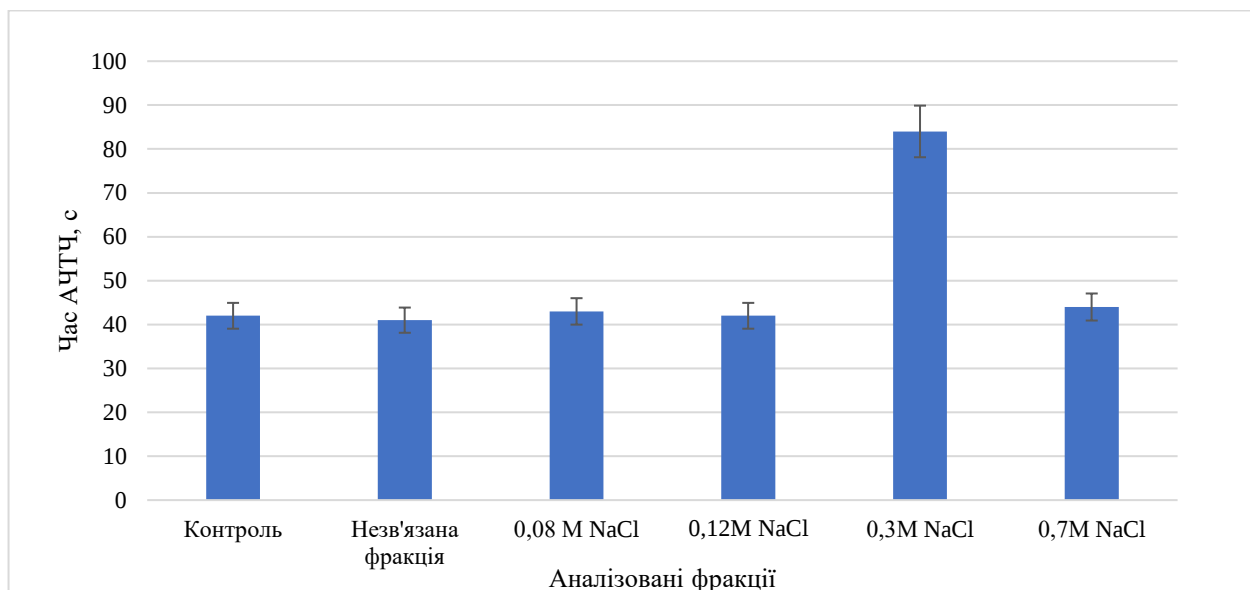


Рисунок 3.4 – Тест АЧТЧ отриманих фракцій після розділення незв'язаної фракції отрути *G. halys* на Q-Sepharose

Таке подовження часу зсідання може бути пов'язано зі знаходженням у цих фракціях ензиму з фібриногеназною активністю.

Отруту *V. lebetina* так само розділили з використанням FPLC-системи АКТА Prime. Хроматографічна колонка з сорбеном Q-sepharose, швидкість потоку 4мл/хв, рухома фаза – 0,05 М тріс-НСІ буфер зі змінною концентрацією солі NaCl (від 0 до 1 М). Зміна концентрації солі відбувалась за наступною схемою: 0 М (вихід незв'язаної фракції), 0,1 М, 0,2М, 0,3М, 0,5М та 0,7М (Рисунок 3.5). Отримані фракції було знесолено та сконцентровано з використанням центрифужних мікроконцентраторів Amicon Ultra 3K. Для характеристики протеїнового складу фракцій було використано гель-електрофорез у системі Лемлі.

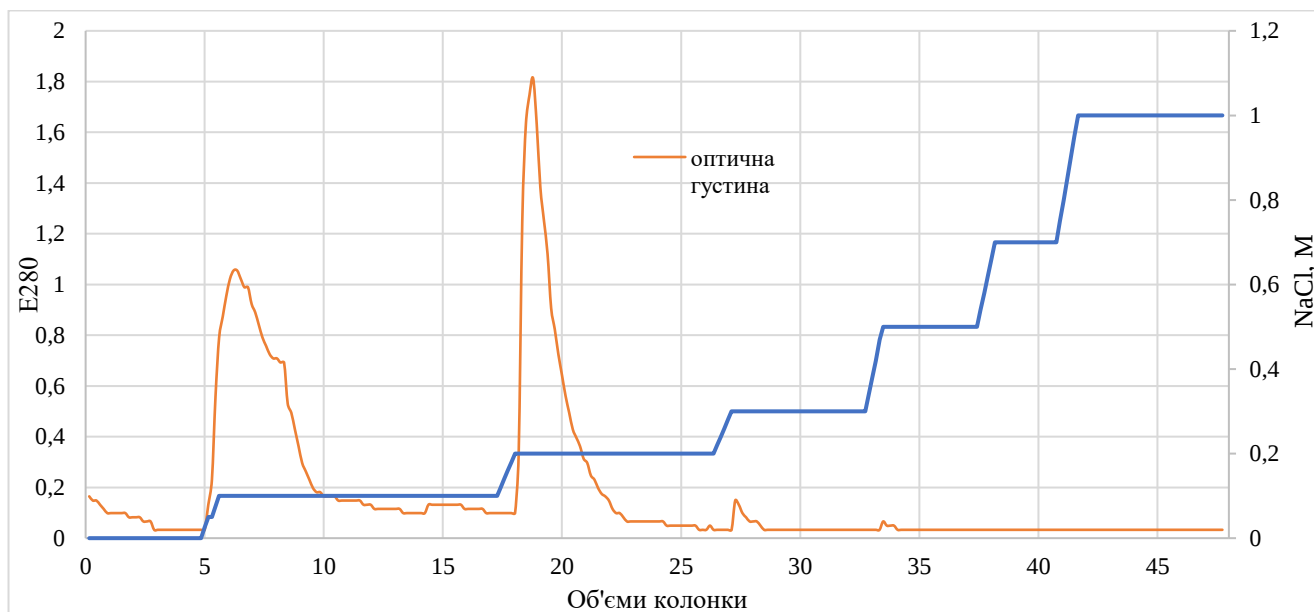


Рисунок 3.5 – Хроматограма отрути цільної отрути *V. lebetina* на Q-сефарозі

Отримані фракції та цільну отруту перевірили на час утворення фібринового згустку з використанням тесту АЧТЧ. Час зсідання був наступним: 67с (контроль), 7с (цільна отрута), 33с (незв'язана фракція), 5с (0,1 М NaCl), 8с (0,2М NaCl), 35 (0,3 М NaCl), 39с (0,5 М NaCl) та 58с (0,7 М NaCl). Таким чином жодна з отриманих фракцій не подовжила час зсідання в порівнянні з контролем. Ймовірна причина – наявність в отруті ферментів, що володіють тромбіноподібною дією, які значно скорочують час утворення згустку в тесті АЧТЧ. (Рисунок 3.6)

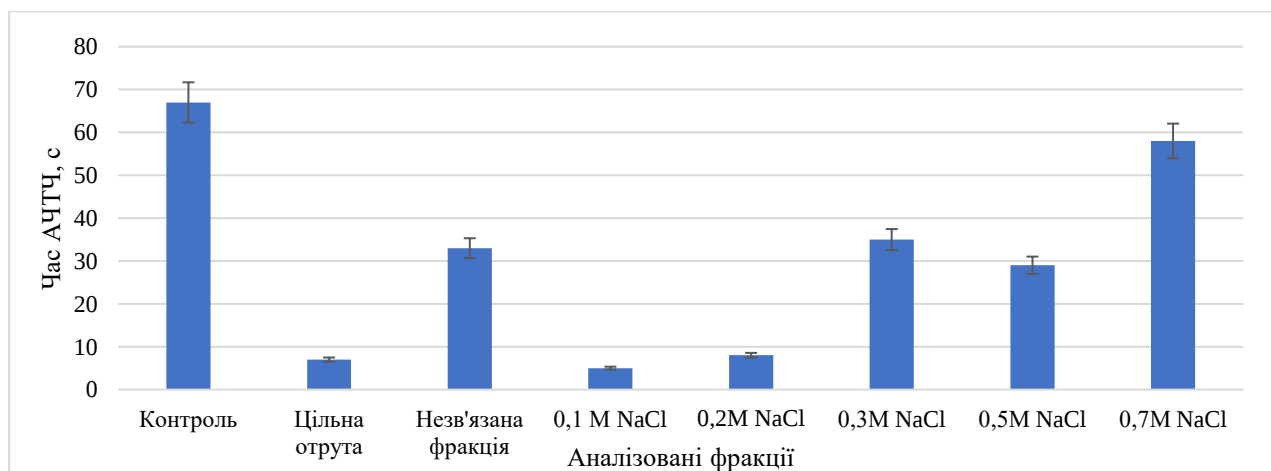


Рисунок 3.6 – Тест АЧТЧ отриманих фракцій після розділення незв'язаної фракції отрути *V. lebetina* на Q-Sepharose

3.2 Перевірка фібриногенолітичної активності

Для визначення в яких саме фракціях можуть знаходитися ферменти з фібриногенолітичною активністю було проведено наступний етап досліджень.

Наявність ферментів з фібриногенолітичною активністю визначали за допомогою ензим-електрофорезу в системі Лемлі. У розділюючий гель перед полімеризацією вносили 0,5 мг/мл фібриногену. Після електрофорезу додецилсульфат натрію видаляли з гелю триразовим відмиванням у 2,5 % розчині тритону X-100 протягом 30 хв. Інкубували гель у 0,1 М гліциновому буфері, рН 8,3 протягом 12 год. Гель забарвлювали Кумасі G-250 та ідентифікували зони протеолітичної активності за розташуванням незабарвлених плям на гелі.

Саме у фракції яку елюювали за концентрації солі 0,3М NaCl з колонки з Q-sepharose з отрути *G. halys* і яка подовжувала час утворення фібринового згустку в тесті АЧТЧ, було виявлено фермент з фібриногеназною активністю (Рисунок 3.7).

При цьому, також, було показано, що даний протеїн є електрофоретично чистий і має молекулярну масу близько 30 кДа (Рисунок 3.7).

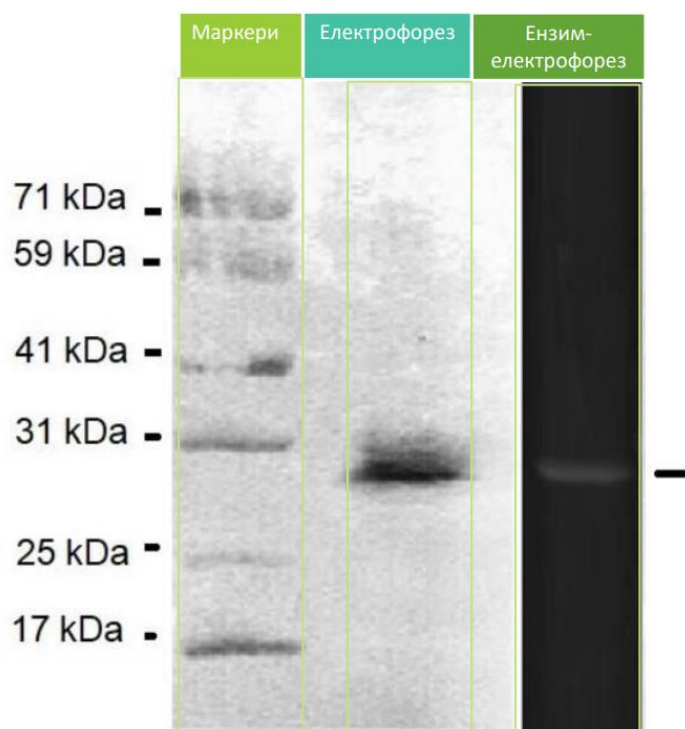


Рисунок 3.7 – Електрофореграма та ензим-електрофореграма фракції з фібриногенолітичною активністю з отрути *G. halys*

Отруту *V. lebetina* також аналізували на наявність ферменту з фібриногенолітичною активністю. Хоча тест АЧТЧ не показав подовження часу утворення згустку з жодною фракцією, результати ензим-форезу показали наявність фібриногенолітичної активності у фракції, що елюювалася за концентрації солі 0,2М NaCl (Рисунок 3.8). Молекулярна маса склала близько 29-30 кДа (Рисунок 3.8)

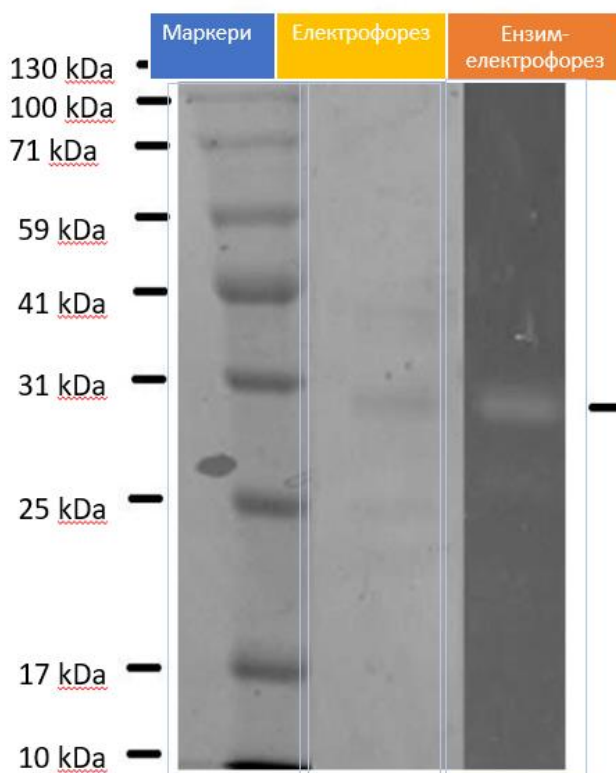


Рисунок 3.8 – Електрофореграма та ензим-електрофореграма фракції з фібриногенолітичною активністю з отрути *V.lebetina*

3.3 Висновки до розділу 3

В отрутах *Vipera lebetina* та *Gloydius halys* виявлено фермент з фібриногеназною активністю. Розділення отрути *Gloydius halys* проводили в 2 етапи: ВЕРХ на Blue-sepharose та ВЕРХ на Q-sepharose. Розділення отрути *Vipera lebetina* проводили на Q-sepharose.

В АЧТЧ тесті виявлено фракції з отрути *Gloydius halys*, що подовжували час зсідання плазми крові. Після першого етапу хроматографі незв'язана фракція подовжує час зсідання крові у 1,6 разів (в порівнянні з контролем). Після розділення незв'язаної фракції на Q-sepharose, фракція, що елюювалась за концентрації солі 0,3М NaCl, виявляла подовження часу зсідання плазми у тесті АЧТЧ у 1,9 разів (у порівнянні з контролем). Фракції з отрути *Vipera lebetina*, які отримали після розділення на Q-sepharose, не подовжували час зсідання плазми крові в тесті АЧТЧ.

Проведення ензим-електрофорезу підтвердило наявність ферменту з фібриногенолітичною активністю у обох отрутах видів *Vipera lebetina*, *Gloydius halys*. Молекулярна маса ензиму склала близько 30 кДа.

4. РОЗРОБКА СТАРТАП-ПРОЕКТУ

4.1 Резюме: конкретизація бізнес-ідеї, мети стартапу, об'єкту дослідження, місця розробки у інноваційному ланцюжку цінності

Тема: одержання фібриногенази з отрути *Glodius halys*.

Мета стартапу: розробити стартап-проект отримання фібриногенази з отрути *Glodius halys* для подальшої фармацевтичної розробки препарату на її основі.

Предмет стартапу: спосіб отримання фібриногенази з отрути *Glodius halys*.

Таблиця 4.1 – Резюме стартап проекту

Критерій	Значення
1. Сутність ідеї	Отримання ферменту з фібриногенолітичною активністю, який може використовуватись для фармацевтичної розробки створення препарату з прямою фібринолітичною дією для лікування тромбозу
2. Наявність аналогів або прототипів ідеї	Компанією Nuvelo розроблявся препарат «альфімепраза», який є α -фібриногеназою з отрути <i>Agkistrodon contortix</i> , але наразі розробка припинена. Інших аналогів на ринку не виявлено.
3. Основна потреба, яку задовольнить реалізований стартап	Буде створено технологію отримання фібриногенази з отрути <i>G. halys</i> . На її основі можна буде синтезувати кДНК, яка її кодує та вставити ген у геном мікроорганізму. Продукт, синтезований мікроорганізмом, може бути очищений та використовуватись в якості препарату для лікування тромбозу.
4. Ступінь розробленості технології реалізації	На стадії розробки

5. КВЕД, до якого може належати дане виробництво	Клас 72.11 Дослідження й експериментальні розробки у сфері біотехнологій
6. Очікувана потужність стартапу (мале підприємство, середнє, велике)	Частина фармацевтичної розробки у фармацевтичній компанії
7. За масштабом виробництва	Одиничне
8. За рівнем спеціалізації	Вузькопрофільне
9. За ресурсами, що споживатимуться	Матеріаломістке, інформаційномістке
10. За чисельністю персоналу	Мале
11. Органи управління при реалізації стартапу	Національні та міжнародні
12. Бажана сфера пошуку капіталу і контролю для реалізації стартапу	Спільна (національна та іноземна)
13. Бажане географічне розташування Стартапу	Стартап предствляє собою частину фармацевтичної розробки для отримання нового препарату. Він може бути реалізований на фармацевтичному підприємстві в Україна
14. Органи управління при реалізації стартапу	Національні та міжнародні
15. За роботою протягом року	Позасезонне
16. За плановим терміном реалізації проекту	Продаж ідеї

4.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу

Зовнішнє середовище включає фактори, які можуть впливати на реалізацію стартапу, зокрема: політика, економіка, демографія, культура, науково-технічний прогрес.

Зовнішнє середовище досліджується за загрозами і можливостями: – як вплинуть на діяльність стартапу на тому чи іншому ринку сучасні тенденції розвитку науки та техніки, економічної ситуації у світі (країні, регіоні), зміна державної політики та законодавства.

Таблиця 4.2 – Аналіз факторів зовнішнього середовища

Фактор	Загрози	Можливості
Політика	1. Зміни у податковій системі, які не на користь проекту 2. Узурпація влади, погіршення військового стану. 3. Корупція у державних структурах.	1. Редагування бюджету стартапу під зміни у податковій системі. 2. Створення «резервного фонду» на випадок непередбачуваних змін 3. Протидія корупції
Економіка	1. Економічна криза та зменшення сплатоспроможності покупців як її наслідок. 2. Економічні негаразди на фірмі, де буде реалізовуватись стартап.	1. Продаж готового продукту за кордон у випадку економічної кризи в Україні. 2. Пошук фірм-кандидатів для продажу стартапу.

Науково-технічний прогрес	1. Не проходження препаратом всіх необхідних етапів досліджень.	1. Модифікація препарату.
Культура	1. Страх населення перед використанням нового препарату.	1. Надання наукових пояснень щодо безпечності препарату.

Фактори оперативного середовища включають: конкурентів, постачальників та споживачів.

Таблиця 4.3 – Аналіз факторів зовнішнього оперативного середовища

Фактор	Переваги	Недоліки
Конкуренти (інші фірми, які можуть розробляти препарати з прямою фібриногенолітичною дією)	1. Стимулювання до швидшої та якіснішої розробки.	1. Отримання більш ефективних препаратів у конкурентів
Постачальники та посередники	1. Відносно недорога вартість отрути <i>Glodius halys</i> та реактивів, для виконання стартапу відносно цілої фармацевтичної розробки нового препарату.	1. Відсутні.
Споживачі	1. Необхідність розробки препарату з прямою фібриногенолітичною дією для більш безпечного лікування тромбозу.	1. Можлива низька ефективність препарату.

Таблиця 4.4 – Аналіз зацікавлених сторін.

Зацікавлена сторона	Вплив її на реалізацію проекту	Цікавість її до проекту	Загальний коефіцієнт впливу на проект
Суб'єкти внутрішнього середовища			
Виробник:			
Виробник отрути	3	1	2
Виробник реактивів	2	1	1,5
Постачальник			
Постачальник реактивів та отрути	2	1	1,5
Споживачі			
Український фармацевтичний ринок	3	5	4
Міжнародний фармацевтичний ринок	4	4	4
Зовнішнє середовище			
Політичні структури			
Податкова служба	2	2	2
Пенсійний фонд	2	2	2
Служба з реєстрації лікарських засобів	5	3	4
Суб'єкти економічного середовища			
Фірма-реалізатор	5	5	5

Таблиця 4.5 – SWOT-аналіз стартап-проекту.

Сильні сторони	Слабкі сторони
- Відсутність іншої технології отримання фібриногенази з отрути <i>Glodius halys</i>	- Стартап лише невелика частина великої фармацевтичної розробки, для його реалізації необхідне проведення всієї розробки, що є складним проектом, який може не завершитись успіхом
Можливості	Загрози
- Реалізація стартапу на будь-якому фармацевтичному підприємстві, яке займається розробкою нових ліків	- Відмова фірм-кандидатів від запропонованої технології отримання фібриногенази

4.3 Визначення ключових факторів успіху проекту

За аналізом факторів зовнішнього і зовнішнього оперативного середовищ визначають ключові фактори успіху власної ідеї, технології, методики. До них належать такі фактори успіху, на які підприємство може самостійно впливати під час виробництва і реалізації продукту.

Конкуренти – інші технології отримання фібриногеназ з отрут змії: конкурент А – технологія отримання фібриногенази з отрути *Agkistrodon contortrix contortrix*, конкурент В – технологія отримання фібриногенази з отрути *Lachesis mutamuta*.

Таблиця 4.6 – Оцінка характеристики за методом Шонфільда.

Характеристика	Коеф. вагомості	Оцінка характеристик		
		Наша технологія	Конкурент А	Конкурент В
Ціна	0,2	3	1	2
Продуктивність	0,4	4	1	2

Кількість постачальників сировини	0,2	3	5	2
Ступінь дослідженості фібриногенази	0,4	5	4	5

З урахуванням коефіцієнтів надається бальна характеристика

Таблиця 4.7 – Бальна характеристика

Характеристика	Бальна оцінка характеристика		
	Наша технологія	Конкурент А	Конкурент В
1. Ціна	0,6	0,2	0,4
2. Продуктивність	1,6	0,4	0,8
3. Кількість постачальників сировини	0,6	1,0	0,4
4. Ступінь дослідженості фібриногенази	2,0	1,6	2,0

За бальною характеристикою побудовано графік (Рисунок 4.1)

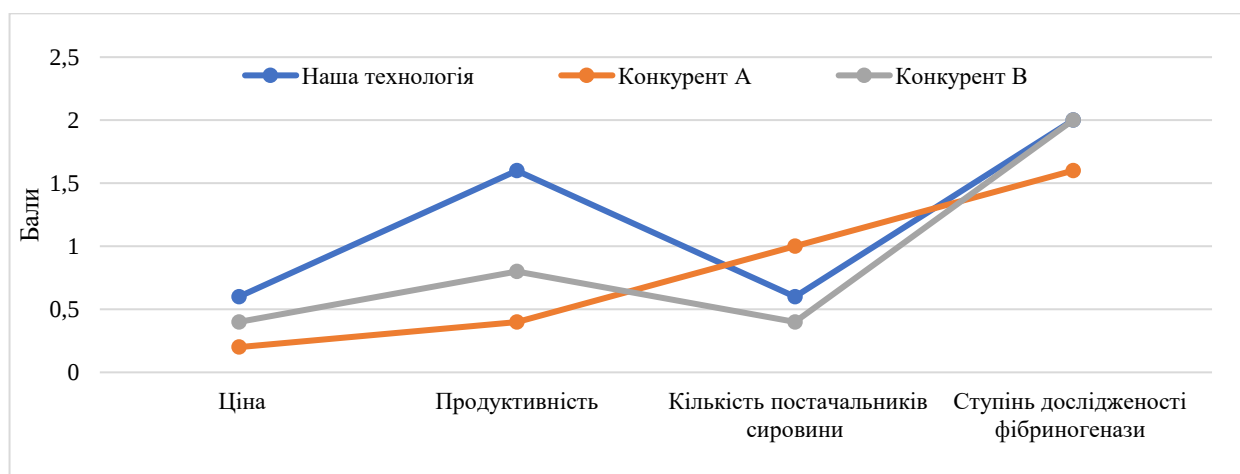


Рисунок 4.1 – Графік порівняння переваг нашої технології та технології конкурентів

Видно, що запропонована технологія отримання фібриногенази з отрути *Glodius halys* має переваги за ціною та продуктивністю над конкурентами, слабким місцем є ступінь дослідженості фібриногенази. З урахуванням цього було створено наступні варіанти розвитку стартапу:

Таблиця 4.8 – Варіанти розвитку стартапу

№	Варіант	Стислий опис можливого розвитку
1	Відтворення даної технології та паралельне вивчення фібриногенази з отрути <i>Glodius halys</i>	Напрацювання ферменту та подальші дослідження для створення препарату-фібринолітика з паралельним вивченням всіх властивостей фібриногенази. Переваги: швидкий варіант для реалізації ідеї стартапу. Недоліки: можливість відмови фірм у покупці ідеї, оскільки фермент достеменно не досліджений.
2	Вивчення властивостей фібриногенази з отрути <i>Glodius halys</i> і продаж ідеї вже після цього	Цей варіант передбачає ще дослідження фібриногенази і тільки потім її отримання для створення препарату. Переваги: досліджений фермент більше зацікавить фірми, які хочуть створити препарат-фібринолітик. Недоліки: Проведення додаткових досліджень, які не стосуються суті стартапу, але характеризують його продукт.

З цих двох варіантів очевидно 2 є більш логічним, тому для реалізації стартапу необхідні дослідження ферменту з фібриногенолітичною активністю з отрути *Glodius halys*. Ці дослідження ще не проведені та вони не стосуються ідеї стартапу, тому включені в нього не будуть.

4.4 Визначення категорій потенційних споживачів

Стартап являє собою ідею отримання фібриногенази з отрути *Glodius halys*, яка далі може бути використана для розробки мікроорганізму-мутанту, який буде здатний синтезувати фібриногеназу. Тому потенційним споживачем є фармацевтичне підприємство.

Таблиця 4.9 – Паспорт потенційного клієнта

Критерій	Категорії
Форма реєстрації	Юридична особа
За масштабом	Великі
КВЕД	Клас 72.11 Дослідження й експериментальні розробки у сфері біотехнологій
За рівнем спеціалізації	Вузькопрофільне
За ресурсами, які споживаються	Інформаційномісткі
За чисельністю персоналу	Середні та великі
За сферою діяльності	Дослідницькі та виробничі
За характером діяльності	Фармацевтика
За наявністю вільних ОБЗ	З наявними вільними коштами, з тендером на розробку
За географічним розташуванням	Територія України, можливо закордонні фірми
За часткою іноземного капіталу	З іноземними інвестиціями

4.5 Ціна реалізації інноваційної технології на ринку

Ціна реалізації технології, розрахована різними методами:

1. Витратний метод:

$$Ц = C + \text{фікс.}\%$$

де Ц - прогнозована ціна реалізації технології отримання фібриногенази, грн

C – собівартість виконання методики

Фікс. – фіксований відсоток (10%)

$$Ц = 480\,000 + 5\% = 504\,000$$

2. Агрегатний метод:

$$Ц = Ц_1 + \dots + Ц_i, \text{ (грн/од),}$$

де Ц – прогнозована ціна реалізації технології отримання фібриногенази, грн

C_i – ціна одного компоненту, необхідного для виконання методики, грн/од.

$$Ц (\text{ідеї}) = 7\,000 \text{ грн}$$

$$Ц (\text{матеріали}) = 455\,000 \text{ грн}$$

$$Ц (\text{робота}) = 10\,000 \text{ грн}$$

$$Ц (\text{амортизація обладнання}) = 70\,000 \text{ грн}$$

$$Ц (\text{витрати електроенергії}) = 1\,300 \text{ грн}$$

$$Ц = 7\,000 + 455\,000 + 10\,000 + 70\,000 + 1\,300 = 543\,300 \text{ (грн)}$$

3. Параметричний метод. Цей метод має можливість враховувати значимість якісних параметрів технології

Таблиця 4.9 – Розрахунок ціни параметричним методом

Технол огія	Параметри						Ціна (один бал = 9930 грн)
	Ціна		Продуктивність		Швидкість отримання		
	Бали	Коеф. Вагомост і	Бал и	Коеф. Вагомост і	Бал и	Коеф. вагомос ті	
Аналог	60	0,3	55	0,5	50	0,2	700 000
Новий	30	0,3	60	0,5	80	0,2	540615

4. Метод на основі аналізу точки беззбитковості. Ціна виробу визначається на основі розрахунку найоптимальнішого обсягу виробництва, який дає змогу відшкодувати всі витрати підприємства за рахунок отриманих валових доходів виходячи з «точки беззбитковості» (Рисунок 4.2).

Вартість обладнання – 360 000грн.

Вартість реактивів – 53 360

Вартість електроенергії – 1 300

Вартість праці – 3 300

Разом: $360\,000 + 53\,360 + 1\,300 + 3\,300 = 417\,960$

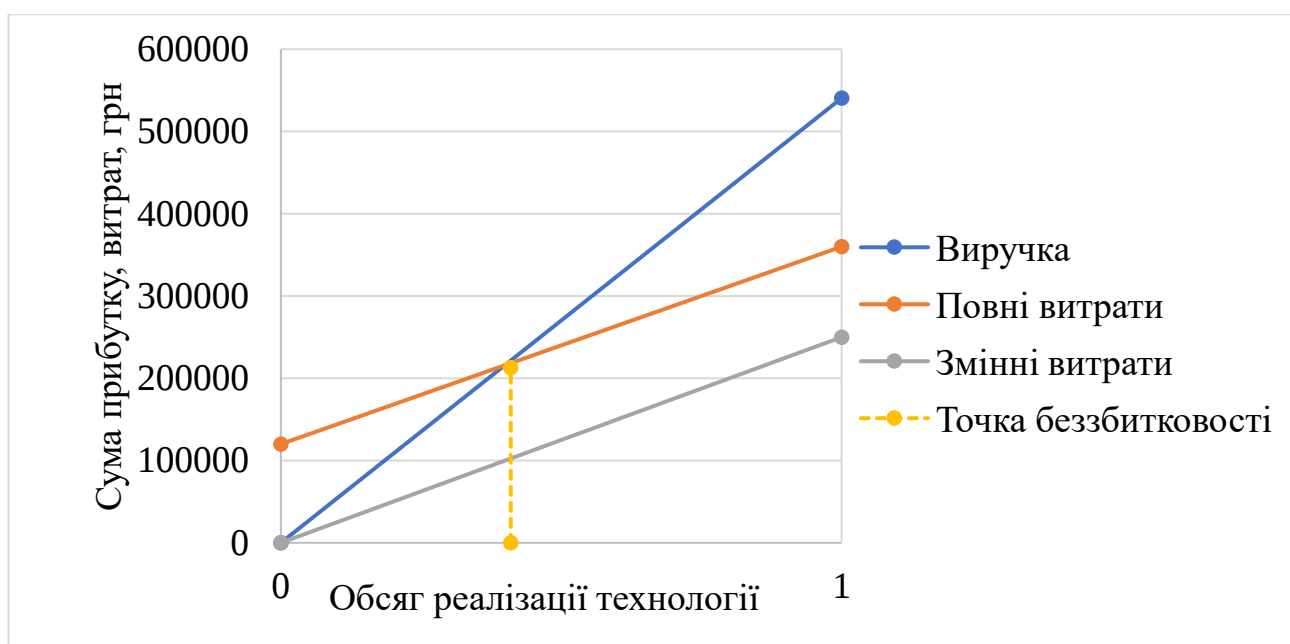


Рисунок 4.2 – Графік беззбитковості

На основі аналізу ціни зазначеними методами, визначено, що оптимальна ціна проведення технології - 546 500 грн.

Таблиця 4.10 – Забезпеченість проекту основними засобами

Місце ОЗ у технологічному процесі	Назва ОЗ	Повна початкова вартість ОЗ (грн)	Плановий період експлуатації ОЗ (міс)	Очікуваний постачальник	Джерело фінансування придбання
ВЕРХ	Рідинний хроматограф	1000000	60	Обладнання має бути в лабораторії розробки	
	Колонка з сорбентом Blue-sepharose	240 000	12	Cytiva	Тендер
	Колонка з сорбентом Q-sepharose	120 000	12	Cytiva	Тендер

Таблиця 4.11 – Забезпеченість проекту оборотними фондами

Група ОБФ	Назва	Норма витрат	Ціна, грн	Очікуваний постачальник	Джерело фінансування
Матеріали	Отрута <i>Glodius halys</i> ліофілізована	100 мг	52 160	Latoxan	Інвестиції
	Трис (гідроксиметил) амінометан	10 г	1 100	Sigma-Aldrich	Інвестиції

	Натрію хлорид	20 г	100	Sigma-Aldrich	Інвестиції
Електроенергія	-	800кВат	1300	Київ-енерго	Інвестиції

Таблиця 4.12 – Трудові ресурси проекту

Категорія кадрів	Назва посади	Чисельність за списком на посаді	Кваліфікаційні вимоги	Плановий рівень заробітної плати, грн/день	Джерело фінансування
Керівник	Керівник фармацевтичної розробки	1	Досвід у розробці нових фармацевтичних препаратів	4 000	Інвестиції
Спеціаліст	Хімік-хроматографіст	1	Досвід роботи у відділі фармацевтичної розробки	2 500	Інвестиції

Останнім етапом при проведенні оцінки показників вартості стартап-проекту є оцінка за техніко-економічними показниками.

Таблиця 4.13 – Техніко-економічні показники проекту

Показники	Одиниця виміру	Умовне позначення, формула розрахунку
1. Обсяг реалізації технології	Од	1
2. Чисельність персоналу та кількість задіяних днів	Осіб/день	Розробка: 1 особа/1 день Реалізація: 2 особи/2 дня
3. у тому числі - основних - допоміжних - інженерно-технічного персоналу	Осіб	1 – керівник 2 – спеціаліст
4. Середньорічний виробіток робітника	Од/особу	1 реалізація технології/ 2 особи
5. Капіталовкладення у проект	Грн	Розробка: 300 Реалізація: 543 000
6. Повна собівартість	Грн	480 000
7. Відносний прибуток	Грн	60 500
8. Рентабельність	%	12,6
9. Період повернення капіталовкладень	Років	8,9
10. Фондовіддача виробничих фондів	Грн/грн	9,89
11. Фондоємкість	Грн/грн	0,10
12. Продуктивність праці	Грн/особа	4,45
13. Коефіцієнт економічної ефективності (окремо на процес розробки і на процес реалізації проекту)		$E = \Pi / K = 60\,500 / 543\,300 = 0,11$

4.6 Концепція бізнес-моделі проекту та карта бізнес-процесів реалізації проекту

Для конкретизації етапів стартап-проекту розроблено карту бізнес-процесів.

Таблиця 4.14 – Карта бізнес-процесів виконання стартап-проекту.

Стадія реалізації стартап-проекту	Бізнес-процеси	Характеристики		
		Задіяні ресурси	Орієнтовна тривалість процесу (год)	Верхня межа фінансових витрат (грн)
1. Розробка ідеї стартапу	1.1 Оцінка можливості проведення методики, визначення відповідального	Керівник лабораторії розробки	1	300
2. Реалізація ідеї стартапу	2.1 Підготування зразків для аналізу	Хімік-хроматографіст	2	400
	2.2 Проведення ВЕРХ на колонці з Blue-sepharose	Хімік-хроматографіст	5	1 000
	2.3 Проведення ВЕРХ на колонці з Q-sepharose	Хімік-хроматографіст	5	1 000
	2.4 Оцінка отриманих результатів	Керівник лабораторії розробки	3	600

Таблиця 4.15 – Системний аналіз бізнес-процесів стартапу

Функції	Керівник лабораторії	Хімік
1.1 Оцінка можливості проведення методики, визначення відповідального	+	
2.1 Підготування зразків для аналізу		+
2.2 Проведення вискоєфективної рідинної хроматографії на колонці з Blue-sepharose		+
2.3 Проведення вискоєфективної рідинної хроматографії на колонці з Q-sepharose		+
2.4 Оцінка отриманих результатів	+	

4.7 Ризики стартап-проекту та методи управління ними

В наступній таблиці подані ризики інноваційної розробки до кожного етапу стартапу.

Таблиця 4.16 – Ризики інноваційної розробки

Стадія реалізації стартап проекту	Бізнес-процеси	Зовнішні ризики	Внутрішні ризики
1. Розробка ідеї статрапу	1.1 Оцінка можливості проведення методики, визначення відповідального	1. Неможливість відтворення технології у фірмі 2. Проблеми з	1. Відсутність необхідного обладнання 2. Відсутність персоналу для

		замовленням реактивів та обладнання	проведення методики
2. Реалізація ідеї стартапу	2.1 Підготування зразків для аналізу	1.Зупинка процесу розробки препарату 2.Неякісні реактиви та отрута	1.Неможливість відтворення методики 2.Помилки при виконанні дослідження 3. Перебої в роботі обладнання
	2.2 Проведення вискоєфективної рідинної хроматографії на колонці з Blue-sepharose		
	2.3 Проведення вискоєфективної рідинної хроматографії на колонці з Q-sepharose		
	2.4 Оцінка отриманих результатів		

За можливими ризиками була проведена оцінка ризиків. Ризики за ймовірністю бувають наступні:

- 1) З низькою ймовірністю виникнення; (1)
- 2) З середньою ймовірністю виникнення (у випадку, коли подібні ситуації траплялись); (2-3)
- 3) З високою ймовірністю виникнення. (4-5)

За впливом на результат ризики поділяють на:

- 1) низького рівня впливу – вплив цих ризиків мінімальний та/або невеликої тяжкості; (1-2)
- 2) середнього рівня впливу – вплив цих ризиків середньої тяжкості; (3-3,5)

3) високого рівня впливу – вплив цих ризиків є тяжким та/або особливо тяжким.(4-5)

В таблиці 4.17 подано ризики за етапами та їх бальні оцінки за критеріями ймовірності настання та впливом на результат.

Таблиця 4.17 – Ризики інноваційної розробки та їх оцінка за критеріями ймовірності та впливу.

Види ризиків	Назва ризику	Ймовірність настання	Вплив на результат
Зовнішні ризики			
Технологічний	Неможливість відтворення технології у фірмі	1	5
Ринковий ризик	Проблеми з замовленням реактивів та обладнання	2	3
Науково-технічний	Зупинка процесу розробки препарату	1	5
Ринковий ризик	Неякісні реактиви та отрута	2	2
Внутрішні ризики			
Організаційний ризик	Відсутність необхідного обладнання	3	4
Організаційний ризик	Відсутність персоналу для проведення методики	1	3
Ризик персоналу	Неможливість відтворення методики	1	5
Ризик персоналу	Помилки при виконанні дослідження	3	3
Технічний ризик	Перебої в роботі обладнання	4	1

Найбільш небезпечними ризиками є проблеми з замовленням реактивів та отрути, відсутність необхідного обладнання та помилки при виконанні досліджень. Відповідно до них розроблено план заходів для управління ризиками.

Таблиця 4.18 – План заходів з управління ризиками

Назва ризику	Назва методу управління ризиком	Відповідальні виконавці	Період виконання / застосування методу	Очікувані результати від впровадження методів управління
Проблеми з замовленням реактивів та обладнання	Ухилення від ризику	Керівник лабораторії	Розробка ідеї стартапу	Замовлення реактивів належної якості
Відсутність необхідного обладнання	Прийняття ризику	Керівник лабораторії	Розробка ідеї стартапу	Відтворення технології на іншому обладнанні або замовлення нового обладнання
Помилки при виконанні дослідження	Попередження (скорочення) ризику	Хімік-хроматографіст	Реалізація ідеї старатапу	Правильна робота персоналу

4.8 Висновки до розділу 4

Було розроблено стартап-проект, який на меті має отримування фібриногенази з отрути *Glodius halys* для подальшої розробки препарату на її основі. Потенційним покупцем ідеї стартап-проекту може виступати фармацевтична компанія, яка планує розробку препарату на основі фібриногенази

з отрут змій. Ціна проведення технології складає 546 500 грн. Стартап-проект не передбачає повернення капіталовкладень, оскільки є тільки початковим етапом великої фармацевтичної розробки. Відносний прибуток реалізації стартап-проекту складає 60 500 грн, рентабельність 12,6%. Капіталовкладення в розробку та реалізацію проекту складають 543 300 грн, забезпечуються за рахунок інвестиції.

ВИСНОВКИ

Наявність ферментів з фібриногеназною активністю підтвердилась в отрутах *Vipera lebetina* та *Gloydius halys*. Для отрути *Gloydius halys* спосіб отримання фібриногенази наступний: елюювання незв'язаної фракції з цільної отрути на Blue-sepharose, розділення отриманої фракції на Q-sepharose з отриманням ферменту за концентрації солі 0,3 М NaCl та подальшим очищенням даної фракції. Для отрути *Vipera lebetina* таким шляхом відокремити фермент з фібриногенолітичною активністю від інших ефекторів гемостазу не вдалось. Для отримання фібриногенази з отрути *Vipera lebetina* необхідні додаткові етапи очистки.

В тесті на визначення активованого часткового тромбопластинового часу виявлено фракції в отруті *Gloydius halys*, які подовжували час зсідання плазми крові. Фракція, яка незв'язується з сорбентом Blue-sepharose, подовжує час зсідання крові у 1,6 разів (в порівнянні з контролем) в тесті АЧТЧ. Після розділення незв'язаної фракції на Q-sepharose, фракція, що елюювалась за концентрації солі 0,3М NaCl, виявляла подовження часу зсідання плазми у тесті АЧТЧ у 1,9 разів (у порівнянні з контролем). Фракції з отрути *Vipera lebetina*, які отримали після розділення на Q-sepharose, не подовжували час зсідання плазми крові в тесті АЧТЧ.

Проведення ензим-електрофорезу підтвердило наявність ферменту з фібриногенолітичною активністю у обох отрутах видів *Vipera lebetina*, *Gloydius halys*. Молекулярна маса ензиму склала близько 30 кДа.

Розроблено стартап-проект отримання фібриногенази з отрути *Gloydius halys* шляхом хроматографічного розділення.

Робота виконувалась у Відділі структури та функції білку Інституту біохімії ім. О.В Палладіна Національної академії наук України. Під керівництвом наукового співробітника Відділу структури та функції білка, Інститут біохімії ім.О.В.Палладіна, к. б. н. Грищука Володимира Івановича. Висловлюється подяка Грищуку В. І. за допомогу у виконанні досліджень, обробці результатів та оформленні магістерської дисертації.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Д. І. Заболотний, В. О. Чернищенко, Т. А. Шидловська, Д. Д. Заболотна, Є. М. Стогній, С. В. Верьовка. Безплазмінові тромболітики: необхідність, можливості та перспективи (огляд літератури і власних досліджень): «Журнал НАМН України», т. 28, № 1-2022, с. 293 – 305
2. Kulman SS, Sabu A. Fibrinolytic enzymes for thrombotic therapy. In: Therapeutic enzymes: function and clinical implications. Adv Exp Med Biol. 2019;1148:345-382. doi: 10.1007/978- 981-13-7709-9_15.
3. Gore JM, Sloan M, Price TR, Randall AM, Bovill E, Collen D, Forman S, Knatterud GL, Sopko G, Terrin ML. Intracerebral hemorrhage, cerebral infarction, and subdural hematoma after acute myocardial infarction and thrombolytic therapy in the Thrombolysis in Myocardial Infarction Study. Thrombolysis in myocardial infarction, Phase II, pilot and clinical trial. Circulation 1991; 83: 448–59.
4. Deitcher SR, Toombs CF. Non-clinical and clinical characterization of a novel acting thrombolytic: alfineprase. Pathophysiol Haemost Thromb. 2005;34(4-5):215-20. doi: 10.1159/000092427. PMID: 16707931.
5. Markland FS, Swenson S. Fibrolase: trials and tribulations. Toxins (Basel). 2010 Apr;2(4):793-808. doi: 10.3390/toxins2040793. Epub 2010 Apr 20. PMID: 22069611; PMCID: PMC3153196.
6. Op den Brouw B, Coimbra FCP, Bourke LA, Huynh TM, Vlecken DHW, Ghezellou P, Visser JC, Dobson JS, Fernandez-Rojo MA, Ikonopoulou MP, Casewell NR, Ali SA, Fathinia B, Hodgson WC, Fry BG. Extensive Variation in the Activities of *Pseudocerastes* and *Eristicophis* Viper Venoms Suggests Divergent Envenoming Strategies Are Used for Prey Capture. Toxins (Basel). 2021 Feb 2;13(2):112. doi: 10.3390/toxins13020112. PMID: 33540884; PMCID: PMC7913145.
7. Kondo K, Zhang J, Xu K, Kagamiyama H. Amino acid sequence of a presynaptic neurotoxin, agkistrodotoxin, from the venom of *Agkistrodon halys Pallas*. J Biochem. 1989 Feb;105(2):196-203. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122639. PMID: 2656663.

8. Olaoba OT, Karina Dos Santos P, Selistre-de-Araujo HS, Ferreira de Souza DH. Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs): A structure-function update. *Toxicon X*. 2020 Jul 21;7:100052. doi: 10.1016/j.toxcx.2020.100052. PMID: 32776002; PMCID: PMC7399193.
9. Wang Q, Ye YJ, Chen F, Zhao H. The relationship between biological activity and the electronic structure and transfer of the whole acidic PLA2 molecule in ab initio level. *Biophys Chem*. 1998 Nov 16;75(2):129-39. doi: 10.1016/s0301-4622(98)00200-2. PMID: 9857481.
10. Kamiguti AS, Zuzel M, Theakston RD. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. *Braz J Med Biol Res*. 1998 Jul;31(7):853-62. doi: 10.1590/s0100-879x1998000700001. PMID: 9698750.
11. Jia LG, Shimokawa K, Bjarnason JB, Fox JW. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. *Toxicon*. 1996 Nov-Dec;34(11-12):1269-76. doi: 10.1016/s0041-0101(96)00108-0. PMID: 9027982.
12. Siigur J, Siigur E. Biochemistry and toxicology of proteins and peptides purified from the venom of *Vipera berus berus*. *Toxicon X*. 2022 Jun 12;15:100131. doi: 10.1016/j.toxcx.2022.100131. PMID: 35769869; PMCID: PMC9234072.
13. Tasoulis T, Isbister GK. A current perspective on snake venom composition and constituent protein families. *Arch Toxicol*. 2023 Jan;97(1):133-153. doi: 10.1007/s00204-022-03420-0. Epub 2022 Nov 27. PMID: 36437303.
14. Ainsworth S, Slagboom J, Alomran N et al (2018) The paraspecific neutralisation of snake venom induced coagulopathy by antivenoms. *Commun Biol* 1(1):34. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0039-1> - DOI
15. Akhtar B, Muhammad F, Sharif A, Anwar MI (2021) Mechanistic insights of snake venom disintegrins in cancer treatment. *Eur J Pharmacol* 899:174022. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174022> - DOI
16. Antoniou SA, Antoniou GA, Learney R, Granderath FA, Antoniou AI (2011) The rod and the serpent: history's ultimate healing symbol. *World J Surg* 35(1):217–221. <https://doi.org/10.1007/s00268-010-0686-y> - DOI

17. Zuhair Amr - Stümpel N, Joger U (2009) Recent advances in phylogeny and taxonomy of Near and Middle Eastern Vipers – an update. In: Neubert E, Amr Z, Taiti S, Gümüş B (Eds) Animal Biodiversity in the Middle East. Proceedings of the first Middle Eastern Biodiversity Congress, Aqaba, Jordan, 20–23 October 2008. ZooKeys 31: 179–191
18. Trummal K, Tõnismägi K, Aaspõllu A, Siigur J, Siigur E. *Vipera lebetina* venom nucleases. Toxicon. 2016 Sep 1;119:39-45. doi: 10.1016/j.toxicon.2016.05.004. Epub 2016 May 11. PMID: 27179419.
19. Siigur J, Aaspõllu A, Siigur E. Biochemistry and pharmacology of proteins and peptides purified from the venoms of the snakes *Macrovipera lebetina* subspecies. Toxicon. 2019 Feb;158:16-32. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.11.294. Epub 2018 Nov 23. PMID: 30472110.
20. Trummal K, Aaspõllu A, Tõnismägi K, Samel M, Subbi J, Siigur J, Siigur E. Phosphodiesterase from *Vipera lebetina* venom - structure and characterization. Biochimie. 2014 Nov;106:48-55. doi: 10.1016/j.biochi.2014.07.020. Epub 2014 Jul 28. PMID: 25079051.
21. Siigur J, Tõnismägi K, Trummal K, Aaspõllu A, Samel M, Vija H, Subbi J, Kalkkinen N, Siigur E. *Vipera lebetina* venom contains all types of snake venom metalloproteases. Pathophysiol Haemost Thromb. 2005;34(4-5):209-14. doi: 10.1159/000092426. PMID: 16707930.
22. Trummal K, Tõnismägi K, Siigur E, Aaspõllu A, Lopp A, Sillat T, Saat R, Kasak L, Tammiste I, Kogerman P, Kalkkinen N, Siigur J. A novel metalloprotease from *Vipera lebetina* venom induces human endothelial cell apoptosis. Toxicon. 2005 Jul;46(1):46-61. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.03.008. PMID: 15922394.
23. Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. Toxicon. 2005 Jun 15;45(8):997-1011. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.02.029. Epub 2005 Apr 18. PMID: 15922771.
24. Gutiérrez JM, Escalante T, Rucavado A, Herrera C. Hemorrhage Caused by Snake Venom Metalloproteinases: A Journey of Discovery and Understanding. Toxins

(Basel). 2016 Mar 26;8(4):93. doi: 10.3390/toxins8040093. PMID: 27023608; PMCID: PMC4848620.

25. Osipov A, Utkin Y. What Are the Neurotoxins in Hemotoxic Snake Venoms? *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 2;24(3):2919. doi: 10.3390/ijms24032919. PMID: 36769242; PMCID: PMC9917609.

26. Paalme V, Trummal K, Samel M, Tõnismägi K, Järvekülg L, Vija H, Subbi J, Siigur J, Siigur E. Nerve growth factor from *Vipera lebetina* venom. *Toxicon*. 2009 Sep 1;54(3):329-36. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.05.001. Epub 2009 May 20. PMID: 19463841.

27. Kakanj M, Ghazi-Khansari M, Zare Mirakabadi A, Daraei B, Vatanpour H. Cytotoxic Effect of Iranian *Vipera lebetina* Snake Venom on HUVEC Cells. *Iran J Pharm Res*. 2015 Winter;14(Suppl):109-14. PMID: 26185512; PMCID: PMC4499433.

28. Archundia IG, de Roodt AR, Ramos-Cerrillo B, Chippaux JP, Olguín-Pérez L, Alagón A, Stock RP. Neutralization of *Vipera* and *Macrovipera* venoms by two experimental polyvalent antisera: a study of paraspecificity. *Toxicon*. 2011 Jun;57(7-8):1049-56. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.04.009. Epub 2011 Apr 21. PMID: 21530569.

29. Yau, Yin Hoe. (2004). Studies on Blood Coagulation Affecting Proteins of *Agkistrodon halys halys* (pit viper) Venom.

30. Park D, Kang I, Kim H, Chung K, Kim DS, Yun Y. Cloning and characterization of novel disintegrins from *Agkistrodon halys* venom. *Mol Cells*. 1998 Oct 31;8(5):578-84. PMID: 9856345.

31. Li S, Wang J, Zhang X, Ren Y, Wang N, Zhao K, Chen X, Zhao C, Li X, Shao J, Yin J, West MB, Xu N, Liu S. Proteomic characterization of two snake venoms: *Naja naja atra* and *Agkistrodon halys*. *Biochem J*. 2004 Nov 15;384(Pt 1):119-27. doi: 10.1042/BJ20040354. PMID: 15285721; PMCID: PMC1134095.

32. Samy, R.P., Gopalakrishnakone, P., Chow, V.T.K. and Ho, B. (2008), Viper metalloproteinase (*Agkistrodon halys pallas*) with antimicrobial activity against multi-drug resistant human pathogens. *J. Cell. Physiol.*, 216: 54-68. <https://doi.org/10.1002/jcp.21373>

33. Bakker HM, Tans G, Yukelson LY, Janssen-Claessen TW, Bertina RM, Hemker HC, Rosing J. Protein C activation by an activator purified from the venom of *Agkistrodon halys halys*. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1993 Aug;4(4):605-14. doi: 10.1097/00001721-199308000-00012. PMID: 8218858.
34. Zou Z, Zeng F, Zhang L, Niu L, Teng M, Li X. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an acidic phospholipase A2 with vasoconstrictor activity from *Agkistrodon halys pallas* venom. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2012 Nov 1;68(Pt 11):1329-32. doi: 10.1107/S1744309112038523. Epub 2012 Oct 30. PMID: 23143242; PMCID: PMC3515374.
35. Warrell D. A. Tropical snake bite: clinical studies in South-East Asia. In: Harris J. B., editor. *Natural Toxins: Animal, Plant and Microbial*. 1st edn. Oxford: Oxford Science Publications; 1986. pp. 20–25.
36. Park D, Kang I, Kim H, Chung K, Kim DS, , Yun Y. Cloning and Characterization of Novel Disintegrins from *Agkistrodon Halys* Venom. *Mol. Cells* 1998;8:578-584.
37. Xie H, Huang M, Hu Q, Sun K, Wu H, Shu W, Li X, Fang L. Agkihpin, a novel SVTLE from *Gloydius halys Pallas*, promotes platelet aggregation in vitro and inhibits thrombus formation in vivo in murine models of thrombosis. *Toxicon*. 2016 Nov;122:78-88. doi: 10.1016/j.toxicon.2016.09.017. Epub 2016 Sep 22. PMID: 27666486.
38. Rodrigues VM, Soares AM, Guerra-Sá R, Rodrigues V, Fontes MR, Giglio JR. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Arch Biochem Biophys*. 2000 Sep 15;381(2):213-24. doi: 10.1006/abbi.2000.1958. PMID: 11032408.
39. Ogawa Y, Murayama N, Fujita Y, Yanoshita R. Characterization and cDNA cloning of aminopeptidase A from the venom of *Gloydius blomhoffi brevicaudus*. *Toxicon*. 2007 Jun 15;49(8):1172-81. doi: 10.1016/j.toxicon.2007.02.012. Epub 2007 Feb 24. PMID: 17383704.

40. Sun MZ, Liu S, Yang F, Greenaway FT, Xu Y. A novel phospholipase A2 from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* venom: purification, proteomic, functional and structural characterizations. *Biochimie*. 2009 Apr;91(4):558-67. doi: 10.1016/j.biochi.2009.01.013. Epub 2009 Feb 6. PMID: 19278623.
41. You WK, Jang YJ, Chung KH, Kim DS. A novel disintegrin-like domain of a high molecular weight metalloprotease inhibits platelet aggregation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Sep 26;309(3):637-42. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.08.049. PMID: 12963038.
42. Shimokawa K, Jia LG, Shannon JD, Fox JW. Isolation, sequence analysis, and biological activity of atrolysin E/D, the non-RGD disintegrin domain from *Crotalus atrox* venom. *Arch Biochem Biophys*. 1998 Jun 15;354(2):239-46. doi: 10.1006/abbi.1998.0698. PMID: 9637732.
43. You WK, Seo HJ, Chung KH, Kim DS. A novel metalloprotease from *Gloydius halys* venom induces endothelial cell apoptosis through its protease and disintegrin-like domains. *J Biochem*. 2003 Nov;134(5):739-49. doi: 10.1093/jb/mvg202. PMID: 14688240.
44. Gornitskaia OV, Rovinskaya IN, Platonova TN. Vydelenie i svoïstva fibrinogenoliticheskogo fermenta iz iada shchitomordnika obyknovennogo (*Agkistrodon halys halys*) [Purification and characterization of the fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon halys halys* venom]. *Ukr Biokhim Zh* (1999). 2002 May-Jun;74(3):42-9. Russian. PMID: 12916236.
45. Stohnii YM, Yatsenko TA, Nikulina VV, Kucheriavyyi YP, Hrabovskyi OO, Slominskyi OY, Savchenko KS, Garmanchuk LV, Varbanets LD, Tykhomyrov AO, Chernyshenko VO. Functional properties of individual sub-domains of the fibrin(ogen) α C-domains. *BBA Adv*. 2023 Jan 5;3:100072. doi: 10.1016/j.bbadv.2023.100072. PMID: 37082262; PMCID: PMC10074951.
46. Karbovs'kyi VL, Levkiv MIu, Savchuk OM, Hornyts'ka OV, Volkov HL, Bukhan Ts. [Plasminogen activator from *Agkistrodon halys halys* venom]. *Ukr Biokhim Zh* (1999). 2006 Nov-Dec;78(6):32-7. Ukrainian. PMID: 17494316.

47. Matsui T, Sakurai Y, Fujimura Y, Hayashi I, Oh-Ishi S, Suzuki M, Hamako J, Yamamoto Y, Yamazaki J, Kinoshita M, Titani K. Purification and amino acid sequence of halystase from snake venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*, a serine protease that cleaves specifically fibrinogen and kininogen. *Eur J Biochem*. 1998 Mar 15;252(3):569-75. doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2520569.x. PMID: 9546675.

48. Madadlou A, O'Sullivan S, Sheehan D. Fast protein liquid chromatography. *Methods Mol Biol*. 2011;681:439-47. doi: 10.1007/978-1-60761-913-0_25. PMID: 20978981.

49. Kawai T, Itoh Y. [Clinical application of fast protein liquid chromatography (FPLC) system]. *Rinsho Byori*. 1990 Jan;38(1):57-60. Japanese. PMID: 2308224.

50. Hu X. Advances in the Application of Liquid Chromatography in the Detection of Pollutants. *Comput Math Methods Med*. 2022 Aug 26;2022:2152615. doi: 10.1155/2022/2152615. PMID: 36060653; PMCID: PMC9439901.

51. Lascu I, Porumb H, Porumb T, Abrudan I, Tarmure C, Petrescu I, Presecan E, Proinov I, Telia M. Ion-exchange properties of Cibacron Blue 3G-A Sepharose (Blue Sepharose) and the interaction of proteins with Cibacron Blue 3G-A. *J Chromatogr*. 1984 Jan 20;283:199-210. doi: 10.1016/s0021-9673(00)96255-1. PMID: 6707117.

52. Subramanian S. Dye-ligand affinity chromatography: the interaction of Cibacron Blue F3GA with proteins and enzymes. *CRC Crit Rev Biochem*. 1984;16(2):169-205. doi: 10.3109/10409238409102302. PMID: 6203683.

53. Wong P, Sritippayawan S, Suwannakhon N, Tapprom A, Deoisares R, Sanguansermisri T. Q Sepharose micro-column chromatography: A simple screening method for identifying beta thalassemia traits and hemoglobin E carriers. *Clin Biochem*. 2016 Nov;49(16-17):1288-1291. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2016.07.003. Epub 2016 Jul 15. PMID: 27399165.

54. Chase HA, Machielse B, Naveh D. Characteristics of the adsorption of immunoglobulin M onto Q Sepharose Fast Flow ion-exchangers. *Bioseparation*. 1997;7(1):47-55. doi: 10.1023/a:1008042032753. PMID: 9615613.

55. Cummins, P. M., Rochfort, K. D. and O'Connor, B. F. (2017). Ion-Exchange Chromatography: Basic Principles and Application. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1485, pp. 209-223

56. Nagatomo S, Kitagawa T, Nagai M. Roles of Fe-Histidine bonds in stability of hemoglobin: Recognition of protein flexibility by Q Sepharose. *Biophys J.* 2021 Jul 6;120(13):2734-2745. doi: 10.1016/j.bpj.2021.05.014. Epub 2021 Jun 2. PMID: 34087219; PMCID: PMC8390899.

57. Ignjatovic V. Activated partial thromboplastin time. *Methods Mol Biol.* 2013;992:111-20. doi: 10.1007/978-1-62703-339-8_8. PMID: 23546708.

58. Ignjatovic V. Prothrombin time/international normalized ratio. *Methods Mol Biol.* 2013;992:121-9. doi: 10.1007/978-1-62703-339-8_9. PMID: 23546709.

59. Yang Y, Du S, Yuan W, Kou Y, Nie B. Prolonged activated partial thromboplastin time predicts poor short-term prognosis in patients with acute pancreatitis: A retrospective cohort study. *Clin Transl Sci.* 2022 Oct;15(10):2505-2513. doi: 10.1111/cts.13378. Epub 2022 Aug 7. PMID: 35871496; PMCID: PMC9579392.

60. GREMY F. L'électrophorèse [Electrophoresis]. *Concours Med.* 1959 Feb 21;81(8):847-52 contd. French. PMID: 13630044.

61. Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL. Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Cold Spring Harb Protoc.* 2021 Dec 1;2021(12). doi: 10.1101/pdb.prot102228. PMID: 34853120.

62. Adams LD, Gallagher SR. Two-dimensional gel electrophoresis. *Curr Protoc Immunol.* 2005 Nov;Chapter 8:8.5.1-8.5.24. doi: 10.1002/0471142735.im0805s68. PMID: 18432958.

63. Sims CE, Luzzi V, Allbritton NL. Localized sampling, electrophoresis, and biosensor analysis of *Xenopus laevis* cytoplasm for subcellular biochemical assays. *Methods Mol Biol.* 2006;322:413-24. doi: 10.1007/978-1-59745-000-3_29. PMID: 16739740.

64. Bachmeyer C, Grateau G, Dhote R, Dauchy F. Une autre électrophorèse insolite [Another uncommon electrophoresis]. *Rev Med Interne.* 1996;17(5):425. French. doi: 10.1016/0248-8663(96)83745-3. PMID: 8763105.

65. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*. 2012 Apr 20;(62):3923. doi: 10.3791/3923. PMID: 22546956; PMCID: PMC4846332.

66. Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol*. 1986 May;51(5):873-84. doi: 10.1128/aem.51.5.873-884.1986. PMID: 2425735; PMCID: PMC238981.

67. Boerlin P, Piffaretti JC. Multilocus enzyme electrophoresis. *Methods Mol Biol*. 1995;46:63-78. doi: 10.1385/0-89603-297-3:63. PMID: 7550720.