

ՀՀ ԿՐԹՈՒՐՅԱՆ, ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ, ՄՇԱԿՈՒՅԹԻ ԵՎ ՍՊՈՐՏԻ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՂՈՒԿԱՍՅԱՆ ԳԵՎՈՐԳ ՎԱՀԱՆԻ

**ԻՇԵՐԻ ԹՈՒՅՆԻ ՖՈՍՖՈԼԻՊԱԶ Ա2 ԵՎ ԴԵԶԻՆՏԵԳՐԻՆՆԵՐԻ
ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ԿԵՆՍԱՖԻԶԻԿԱԿԱՆ ԱՍՊԵԿՏՆԵՐԸ**

Գ.00.02 – Կենսաֆիզիկա, կենսաինֆորմատիկա մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՄԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2022

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ, КУЛЬТУРЫ И СПОРТА РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ГУКАСЯН ГЕВОРГ ВАГАНОВИЧ

**БИОФИЗИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ ФОСФОЛИПАЗ А2 И
ДИЗИНТЕГРИНОВ ЯДА ГАДЮК**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.02 – Биофизика, биоинформатика

ЕРЕВАН – 2022

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում:

Գիտական ղեկավար՝ կենս. գիտ. դոկտոր Ն.Մ. Այվազյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր, դոցենտ Ա.Պ. Անտոնյան
կենս. գիտ թեկ., դոցենտ Ա.Ա. Հովհաննիսյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Մեչենովի անվան էվոլյուցիոն ֆիզիոլոգիայի և
կենսաքիմիայի ինստիտուտ, ՌԳԱ,
Սանկտ Պետերբուրգ, ՌԴ

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2022թ. դեկտեմբերի 23-ին ժամը 14⁰⁰-ին Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈԿ-ի Կենսաֆիզիկայի 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան փող. 1, ԵՊՀ կենսաբանական ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2022թ. նոյեմբերի 11-ին:

051 մասնագիտական խորհրդի

Գիտական քարտուղար, կ.գ.դ., դոցենտ



Մ.Ա. Փարսադանյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете.

Научный руководитель: доктор биол. наук Н. М. Айвазян

Официальные оппоненты: доктор биол. наук, доцент А.П. Антонян
кандидат биол. наук, доцент А.А. Оганесян

Ведущая организация: Институт эволюционной физиологии и биохимии
имени Сеченова РАН, Санкт Петербург, РФ

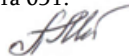
Защита диссертации состоится 23-го декабря 2022г. в 14⁰⁰ часов, на заседании Специализированного совета 051 по Биофизике ВАК РА при Ереванском государственном университете (0025, г. Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 11-го ноября 2022г.

Ученый секретарь Специализированного Совета 051.

доктор биол. наук, доцент



М.А. Парсаданян

ՆԵՐԱՄՈՒԹՅՈՒՆ

Թեմայի արդիականությունը: A2 դասի ֆոսֆոլիպազները հանդիսանում են լուծելի ֆերմենտներ և կատալիզում են ֆոսֆոլիպիդների 2 ացիլ խմբի հիդրոլիզը, որի արդյունքում առաջանում են ճարպաթթուներ եվ լիզոֆոսֆոլիպիդներ (Tonello F. & Rigoni M., 2017): Չնայած ֆոսֆոլիպազ A2 լայն տարածում ունի կենդանական աշխարհում և ակտիվ ուսումնասիրվում է, այս ֆերմենտի ազդման մեխանիզմները օրգանիզմում շարունակում են մնալ չբացահայտված: Դրա պատճառն է հանդիսանում ֆերմենտի ձևերի մեծ բազմազանությունը, որը դասակարգում են տարբեր խմբերի՝ ելնելով սպիտակուցների եռաչափ կառուցվածքից, ամինաթթվային կազմից, կատալիտիկ յուրահատկություններից և այլն: Օձի թույները I և II խմբերի ֆոսֆոլիպազ A2 լավ աղբյուր են հանդիսանում: Իրենց առաջնային և երկրորդական կառուցվածքով օձի թույնի ֆոսֆոլիպազ A2 նմանվում են կաթնասունների օրգանիզմում առկա ֆոսֆոլիպազ A2-ին, սակայն դրանց առաջացրած ֆարմակոլոգիական ազդեցությունը խիստ տարբեր է: Հաստատված է, որ Ֆոսֆոլիպազ A2-ները մեծ դեր են խաղում բորբոքային պրոցեսի զարգացման մեջ: Ֆերմենտի ներդրումը կայանում է այդ ռեակցիայի լիպիդային ուղղորդիչների սինթեզի մեկնարկի մեջ, այսպես կոչված, բորբոքման քիմիական մեդիատորների: Առաջանում են, ակտիվանում են կամ մոբիլիզացվում են բորբոքման օջախում, և դրանց հարաբերակցությամբ որոշվում է պաթոլոգիզ պրոցեսի ընթացքի բնույթը: Լիպիդային բնույթի բորբոքման մեդիատորները ներկայացված են ճարպաթթուներով և դրանց ածանցյալներով (պրոստոգլանդիններով, լեյկոտրիններով, թրոմբոքսաններով), ինչպես նաև թրոմբոցիտների ակտիվացման ֆոսֆոլիպիդային ֆակտորով (PAF):

Ի տարբերություն ֆոսֆոլիպազ A2, որի տարատեսակ ձևերը և իզոէնզիմները ուսումնասիրության կենտրոնում են գտնվում 1944 թվականից առ այսօր, դեզինտեգրին թերմինն առաջին անգամ օգտագործվել է 90-ական թվականներին որպես իժերի թույնից տարանջատված ոչ էնզիմատիկ փոքր պրոտեինների անվանում, որոնք ունեն յուրահատուկ կառուցվածքային և ֆունկցիոնալ առանձնահատկություններ (Kini M.R., 2005): Դեզինտեգրինները ճնշում են ինտեգրին-լիզանդ փոխազդեցությունը: Դեզինտեգրինների մեծամասնությունը ցիստեինով հարուստ պեպտիդներ են և ամենակարճ դեզինտեգրինը, որի կազմում կա ընդամենը 41 ամինաթթվային մնացորդ, անջատվել է հենց անդրկովկասյան գյուրգայի թույնից (*Macrovipera lebetina obtusa*) (Cesar P. Et al., 2019): Ինչպես ցույց տվեցին ուսումնասիրություններն, այն ճնշում է ալֆա1/բեթա1 ինտեգրինի կապը կոլագեն 4-ի հետ, ուղղակի կապվելով նրան, այն չի ճնշում այլ ինտեգրիններ և խիստ սպեցիֆիկ է: Արգելակելով բջիջների կապը միայնաց հետ՝ օբտուսատինը հանդիսանում է անգիոզենեզը խանգարող միացություն և, ըստ *in vivo* փորձերի, կարող է դադարեցնել արագընթաց քաղցկեղի բջիջների պրոլիֆերացիան (Ghazaryan N. Et al., 2019):

Ուսումնասիրության նպատակն ու խնդիրները: Ներկայացվող հետազոտության նպատակն է հանդիսացել բազմակողմանի ուսումնասիրել դեղաբանական հետաքրքրություն ներկայացնող կովկասյան գյուրգայի թույնի (*Macrovipera lebetina*

obtusa, MLO) առանձին և առավել ակտիվ բաղադրիչների կառուցվածքաֆունկցիոնալ առանձնահատկությունները՝ համեմատելով տվյալ դասերի նյութերի այլ ներկայացուցիչների կենսաաֆիզիկական հատկությունների հետ: Գնահատել թույնի բաղադրիչների սիներգիկ փոխազդեցության աստիճանը, այդ թվում նաև նորագույն սերնդի նանոմասնիկների հետ փոխազդեցության ժամանակ՝ ընկալելով վերջիններին որպես օրգանիզմում դեղամիջոցների թիրախային տեղափոխման կրիչ: Առավելագույն չափով հետազոտել նշված կենսաբանորեն ակտիվ մոլեկուլների կառուցվածք-ֆունկցիա կապի մեխանիզմները, որոնց շնորհիվ դրանք խիստ յուրահատուկ ազդեցություն են ունենում կենդանի հյուսվածքների վրա:

Հետազոտության նպատակի իրականացման համար սահմանվել են հետևյալ խնդիրները.

1. Ուսումնասիրել կովկասյան գյուրգայի թույնի և կաթնատունների ենթաստամոքսային գեղձի ֆոսֆոլիպազ Ա2-ի կոնֆորմացիաների փոփոխությունների՝ նանոմասնիկների հետ փոխազդեցության ժամանակ:
2. Ուսումնասիրել Էրիթրոցիտների ստվերների և լիպոսոմների վրա ֆոսֆոլիպազ Ա2-ի տարբեր իզոֆորմների մեմբրանոթրոպ ազդեցությունը՝ ներառյալ դրանց ազդեցությունը ԱԵՖ-ազային ակտիվության վրա:
3. Գնահատել ֆոսֆոլիպազ Ա2-ի տարատեսակների ակտիվությունը և երկրորդային կառուցվածքի յուրահատկությունները կենսաաֆիզիկական մեթոդներով:
4. Բացահայտել կովկասյան գյուրգայի թույնի և այլ թույներից անջատված ֆոսֆոլիպազ Ա2-ի տարբեր իզոֆորմների սիներգիզմի աստիճանը մոդելային թաղանթներում:
5. Որոշել տարատեսակ դեզինտեգրինների թաղանթների հետ կապման կինետիկ պատկերը՝ որոշակի ինտեգրինների հետ փոխազդեցության ժամանակ:
6. Գնահատել դեզինտեգրինների հակաադիեզինոն հատկությունները տարբեր քջջային համակարգերում:

Աշխատանքի գիտական նորույթն ու գիտագործնական նշանակությունը:

Ֆոսֆոլիպազ Ա2-ի հետազոտությունների հետաքրքրությունը կապված է այս ֆերմենտի՝ արախիդոնանթթվի մետաբոլիզմում ունեցած դերով: Պոլիենային ճարպաթթուները՝ ներառյալ արախիդոնաթթուն, մեծացնում են անոթային թափանցելիությունը, հրահրում են թրոմբոցիտների ագրեգացիա, ցուցաբերում են վազոակտիվ գործառույթ: Ֆոսֆոլիպազային հիդրոլիզի ռեակցիայի այլ պրոդուկտներ են լիզոֆոսֆոլիպիդները, որոնք օժտված են արտահայտված ցիտոտոկսիկությամբ և դետերգենտ հատկություններով: Այսպիսի միացությունները հայտնաբերվում են այնպիսի հիվանդությունների ժամանակ, ինչպիսին խոլեցիստիտն է, միոկարդի ինֆարկտը, կատարակտը, պտորիազը և այլն: Եթե ճարպաթթուն ֆոսֆատիդիլխոլինից տարանջատվում է 1-Օ-ալկիլային ձևի, առաջացած ֆոսֆոլիպիդը հանդես է գալիս որպես նախանյութ PAF-ի համար, որը բորբոքման, ալերգիկ ռեակցիայի, սեպտիկ շոկի և ասթմատիկ վիճակի մեղիատոր է: Նմանատիպ միջնորդված ազդեցության մեխանիզմների ուսումնասիրությունն ակնհայտ

հետաքրքրություն է ներկայացնում այսպես կոչված “spreading” էֆեկտի և սիներգիզմի տեսության բնագավառում հիմնարար պարզաբանումներ կատարելու համար:

Սակայն տվյալ ուսումնասիրություններն ունեն նաև ուղղակի կիրառական նշանակություն, քանի որ վկայում են, որ օձի թույնի ակտիվ բաղադրամասերը կարող են ունենալ դրական ազդեցություն ինչպես արագ զարգացող քաղցկեղների տարբեր տիպերի (մասնավորապես՝ սարկոմաների), այնպես էլ բազմաթիվ այլ (մասնավորապես՝ բորբոքային) հիվանդությունների կասեցման գործում: Այս սպիտակուցներից շատերն այսօր կարող են դառնալ դեղագործության նոր, ժամանակակից ուղղության զգալի մաս: Այսպիսով, նշված հետազոտությունն ակնհայտ գիտագործնական արժեք է ներկայացնում, այն է՝ Հայաստանի էնդեմիկ հերպետոֆաունային յուրահատուկ կենսաբանական ակտիվ նյութերի հնարավոր հակաուռուցքային և հականեյրոդեգեներատիվ հատկությունների բացահայտումը:

Պաշտպանության ներկայացվող հիմնական դրույթներն են.

1. Ե՛վ օբտուսատինը, և՛ ֆոսֆոլիպազ Ա2 օժտված են յուրահատուկ հատկություններով, որոնք՝ երկրորդային կառուցվածքի աննշան փոփոխության արդյունքում կարող են հանդիսանալ ակտիվ ֆարմակոլոգիական ռեագենտ:
2. Ֆոսֆոլիպազ Ա2-ի իզոֆորմների կառուցվածքային նմանությունը և խիստ սիներգիզմը այն դարձնում էլ նանոմասնիկների հետ համալիր ազդման դեղորայքի հաջող նախատիպ:
3. Մոդելային փորձերում օբտուսատինը և կովկասյան գյուրգայի թույնը ֆոսֆոլիպազ Ա2 ցուցաբերում են տարբեր մեխանիզմներով պայմանավորված մեմբրանոթրոպ հատկություններ՝ ինչպես սուպրամոլեկուլյար, այնպես և հյուսվածքային մակարդակում:
4. Կովկասյան գյուրգայի թույնի բաղադրամասերը օժտված են ախտադեղագործական ակտիվությամբ և կարող են ցուցաբերել օնկոստատիկ հատկություններ ուռուցքների բջջային մոդելներում:

Աշխատանքի փորձարկումը և հրապարակումները:

Ատենախոսության արդյունքները ներկայացվել են տարբեր սեմինարներում և միջազգային գիտաժողովներում: Հրատարակված են թեմայի հետ առնչվող 17 աշխատանք, որոնցից 6 հոդված և 11 թեզիս:

Ատենախոսության կառուցվածքը և ծավալը: Ատենախոսության ծավալը կազմում է 119 էջ: Այն բաղկացած է հետևյալ գլուխներից՝ ներածությունից, գրական ակնարկից (Գլուխ 1), փորձարարական մասից (Գլուխ 2), արդյունքներից և դրանց քննարկումից (Գլուխ 3), ամփոփումից, եզրակացություններից, օգտագործված գրականության ցանկից (ընդհանուր 112 աղբյուր): Աշխատանքը պարունակում է 5 աղյուսակ և 48 նկար:

ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ ԵՎ ՆՅՈՒԹԵՐԸ

2.2.1 Ֆլուորեսցենսային սպեկտրների գրանցումը: Նմուշների ֆլուորեսցենսային սպեկտրների գրանցումը իրականացվել է Jasco FP-6300 (Ճապոնիա) սպեկտրոֆլուորիմետրի միջոցով՝ 3 մմ օպտիկական հաստությամբ քվարցե կյուվետում: Ճեղքի լայնությունը գրգռման և լուսարձակումը գրանցելու միջև կազմել է 10 նմ: Սպիտակուցների սեփական ֆլուորեսցենցիայի գրգռումը տեղի է ունեցել $\lambda=270$ նմ ալիքի երկարության տակ, իսկ ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրների գրանցումը 320-360 նմ ալիքների երկարության միջակայքում:

2.2.2 «Ձետա» պոտենցիալի չափումը: «Ձետա» պոտենցիալի չափումը կատարվել է Zetasizer Nano 2000 անալիզատորի օգնությամբ (Մավվերն, Միացյալ Թագավորություն) 10 մմ օպտիկական հաստությամբ քվարցե կյուվետում: Օգտագործելով լույսի դինամիկ ցրումը, հնարավոր է չափել չափսը, մակերևութային լիցքը, մասնիկների մոլեկուլային մասան, դրանց էլեկտրոֆորետիկ շարժունությունը, ինչպես նաև՝ իրականացնել նմուշների ավտոմատ pH-տիրում և իոնային ուժի ավտոմատացված փոփոխում: Մասնիկների կախույթը տեղադրվում է էլեկտրական դաշտում, որի ազդեցության տակ նրանք շարժվում են իրենց «ձետա» պոտենցիալից կախված արագությամբ, որը չափվում է M3-PALS արտոնագրված տեխնոլոգիայի միջոցով (լույսի ցրումը փուլային վերլուծությամբ)՝ հաշվարկելով «ձետա» պոտենցիալը և դրա բաշխումը:

2.2.3 Միկրովայրկյանային ֆոսֆորեսցենցիայի մարման կինետիկայի գրանցում և վերլուծություն: Ֆոսֆորեսցենցիայի մարման կինետիկայի չափումն իրականացվել է Բելառուսի ԳԱԱ Բ. Ի. Ստեպանովայի անվան ֆիզիկայի ինստիտուտի ատոմային և մոլեկուլային կառույցների ֆոտոնիկայի կենտրոնում ավտոմատացված լազերային սպեկտրոմետրով, որը թույլ է տալիս գրանցել լուսարձակման գրանցման տարբեր երկարությամբ ալիքների լյումինեսցենցիայի կինետիկան, ինչպես նաև լուսարձակման մարման փուլում ակնթարթային լյումինեսցենցիայի սպեկտրները՝ միկրովայրկյանային տիրույթում:

2.2.4 Ֆոսֆոլիպազ A2-ի երկրորդային կառուցվածքի ուսումնասիրությունը նանոմասնիկների հետ փոխազդեցության ժամանակ շրջանային դիքրոիզմի մեթոդով: Ֆոսֆոլիպազ A2-ի շրջանաձև դիքրոիզմի սպեկտրի չափումներն իրականացվել են Esca 815 CD (Ճապոնիա) սպեկտրոֆոտոմետրի օգնությամբ, քվարցային կյուվետում՝ 3 մմ օպտիկական ուղիով: Շրջանաձև դիքրոիզմի սպեկտրների չափումն իրականացվել է 195 նմ-ից մինչև 260 նմ ալիքի երկարության տիրույթում:

2.2.5. Ֆոսֆոլիպիդների անջատումը և հսկա միալամել վեզիկուլների ստացումը: Ֆոսֆոլիպիդների ընդհանուր ֆրակցիան ստանում են խոշոր եղջերավոր անասունի ուղեղից Մյուլերի մեթոդով քլորոֆորմ/մեթանոլային 0.2 մգ/մլ խտության լուծույթում (1:2 մույար հարաբերությամբ): Հետագայում քլորոֆորմ/մեթանոլային լուծույթից

ագատվելու համար օգտագործվել է վակուումային պոմպ: Վեզիկուլների պատրաստման համար կիրառվել է Անգելովայի և Դիմիտրովի կողմից առաջարկված էլեկտրոֆորմացիոն մեթոդը:

2.2.6. Էրիթրոցիտների ստվերների ստացումը: Արյան նմուշները վերցնում են հատուկ փորձանոթներով (հեպարինացված, 4% 20G; Viggo-Spectramed, Swindon, UK): Էրիթրոցիտների թաղանթները ստացվել են ըստ Դոջի, Միտչլի և Հանսհանի մեթոդի: Ստացված նմուշները օգտագործվել են Լոուրիի մեթոդով սպիտակուցի որոշման, մանրադիտման և ԱԵՖազային ակտիվության դիտարկման համար:

2.2.7. (Na⁺, K⁺)- և (Ca²⁺, Mg²⁺)-ԱԵՖազային ակտիվության որոշում: Na⁺/K⁺ և Ca²⁺/Mg²⁺ ԱԵՖազային ակտիվության որոշումն իրականացվել է Հեսկեթի մեթոդով: Na⁺/K⁺-ական ԱԵՖազի ակտիվությունը որոշելու համար օգտագործվել է 2 մՄ ուաբաին: Ակտիվությունը հաշվարկվել է ուաբաինի առկայության և բացակայության ժամանակ արժեքների տարբերությամբ: Ca²⁺/Mg²⁺-ական ԱԵՖազայի ակտիվությունը որոշվել է ընդհանուր և Mg²⁺-ԱԵՖազային ակտիվության տարբերությամբ, որից հետո Ֆիսկե և Սուբառոույի մոդիֆիկացված մեթոդով որոշվել է անջատված անօրգանական ֆոսֆորի քանակը: Ֆերմենտի ակտիվությունը արտահայտված է *մկմոլ/Փլ/մկգ սպիտ/րոպե*:

2.2.8. Ֆլուորեսցենտային թաղանթային զոնդերի մեթոդ և GP/3wGP առժեքների հաշվարկում: Լիպիդների փուլային վիճակը պեպտիդների կապման տեղամասերում գնահատվում է ՊԼՈՂԱՆ-ի (6-պրոպիոնիլ 1-2-(դի մեթիլ ամինո) նավթալեն) ավելացումով, որը հիմնականում ներդրվում է հեղուկ միջավայրում: Մյուս զոնդը՝ ԼԱՈՒԴԱՆը (6-լաուրո-1-2-(դի մեթիլ ամինո)նավթալեն), կարող է տեղեկատվություն տալ լիպիդային երկշերտի մեջ ներթափանցած ջրի մասին, ինչը նույնպես թույլ է տալիս գնահատել թաղանթի միկրոմածուցիկությունը: Թաղանթում PLA2-ի կողմից բևեռայնության փոփոխությունները հայտնաբերելու համար դրանք սկզբում լուծել են դիմեթիլսուլֆօքսիդում (ԴՄՍՕ), այնուհետև ավելացրել լիպոսոմներին, զոնդ-լիպիդ մոյլար հարաբերակցությունը՝ 1:10 000, օրգանական լուծիչի կոնցենտրացիան պահելով ցածր: Ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրները ստացվել են Varian Eclipse սպեկտրֆլյուրոմետրով, ԼԱՈՒԴԱՆի և ՊԼՈՂԱՆի գրգռման ալիքի երկարությունը ֆիքսվել է 340-360 նմ: Թաղանթի բևեռայնության ավելի հստակ պատկեր ունենալու համար օգտագործվել է բևեռացվածության ընդհանրացված ֆունկցիա (GP): GP-ն հաշվարկվել է որպես

$$GP = (I_{440} - I_{490}) / (I_{440} + I_{490}),$$

որտեղ I₄₄₀-ը և I₄₉₀-ը համապատասխանաբար կապույտ և կանաչ լուսարձակումների ինտենսիվություններն են: ՊԼՈՂԱՆի դեպքում ավելի չզգրիտ GP առժեքներ կարելի է ստանալ երեք կետով լուսարձակման գրանցման պարագայում (այսպես կոչված՝ 3wGP մեթոդ, I₁ = 420 նմ, I₂ = 480 նմ, I₃ = 530 նմ), որը թույլ է տալիս ավելի հստակ տարանջատել ՊԼՈՂԱՆ-ի տարբեր միկրոմիջավայրում մաքսիմումները և հետևաբար, ավելի նուրբ անալիզի ենթարկել թաղանթների վիճակից կախվածությունը:

2.2.9. Մակերեսային ակուստիկ ալիքների մեթոդ: Ֆիքսված հաճախականությամբ լայնակի ձայնային ալիքները գեներացվում են տակդիրի պլեգոլեկտրիկ նյութում և շարժվում են չիպի մակերեսի վրա երկայնությամբ (SAW Instruments, Գերմանիա): Շարժական փուլը (բուֆեր) ընթանում է չիպի պինդ փուլի վրայով, որի ընթացքում կախված քաշի և նյութի մակերևութից կախված կոնֆիգուրացիայի փոփոխությունից, փոխվում են նաև տատանումների առանձնահատկությունները: Էրիթրոցիտների ստվերները և լիպոսոմները ֆիքսվում են CH₃-SAW-ի մակերեսին (ոչ յուրահատուկ կապում, դրական լիցքավորված մակերևույթ): Շարժական փուլ հանդիսանում են ֆոսֆատային բուֆերում լուծված դեզինտեգրինները (pH 7,4), իսկ հոսքի արագությունն է՝ 20 մկ/րոպե: Խնամակցության որոշման համար կապման կինետիկ հաստատունները հավասարակշռության վիճակում K_D –ն 1:1 կապման մոդելից ելնելով հաշվարկվում են կորի թեքությամբ

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

Որտեղ k_{off} (s^{-1})–ն դիսոցացիայի արագության հաստատունն է, իսկ k_{on} ($կոնց. \cdot s^{-1}$)–ն ասոցացիայի արագության հաստատունն է:

2.2.10. Ֆոսֆոլիպազ A2-ի ակտիվության որոշում և Ռաման սպեկտրոսկոպիա: Ֆոսֆոլիպազային ակտիվության հայտնաբերման համար օգտագործվել է cPLA2 Assay Kit (Cayman Chemicals, USA), որի աշխատանքի հիմքում ընկած է ֆոսֆոլիպազ A2-ի ունակությունը հիդրոլիզել առախիդոնոլի-թիո-ֆոսֆատիդիլալի սինթետիկ սուբստրատի sn-2 դիրքում կապը՝ առաջացնելով ազատ թիոլ, որը կարելի է հայտնաբերել DTNB (5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid), այն է Էլմանի ռեագենտի միջոցով: Ռաման սպեկտրոսկոպիայի տվյալները գրանցվել են HoribaXploRa PLUS (Ֆրանսիա) կոնֆոկալ ռաման մանրադիտակի միջոցով: Չափումների համար օգտագործվել է ինֆրակարմիր լազերը (785նմ)՝ նմուշների սեփական լյումինեսցենցիայից խուսափելու նպատակով, կիրառվել է մեկ կետում չափման մեթոդը:

2.2.11. Փորձարարական տվյալների վիճակագրական մշակում: Արդյունքների մշակումն իրականացվել է մաթեմատիկական վարիացիոն վիճակագրության մեթոդներով՝ այն է միջին «± SEM» տեսքով, սխալը որոշելու համար օգտագործվել է Ստյուդենտի չափանիշը, $p < 0,95$ -ի կանխորոշված վստահելի հավանականության դեպքում: Որոշ փորձարարական շարքերի համար միջին արժեքների տարբերության նշանակությունը գնահատվել է ANOVA-ի օգնությամբ, զուգորդված Բոնֆերրոնի թեստով, երբ տարբեր փորձարարական խմբեր համեմատվել են ստուգիչի հետ: $P < 0.05$ մեծությունը համարվում է հավաստի: Փորձարարական տվյալների որոշ շարքեր նպատակահիմար ենք գտել նաև մշակել GraphPad Software (USA, www.graphpad.com) միջոցով:

ԱՐԴՑՈՒՆՔՆԵՐԸ ԵՎ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄԸ

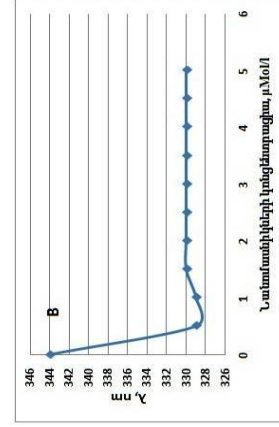
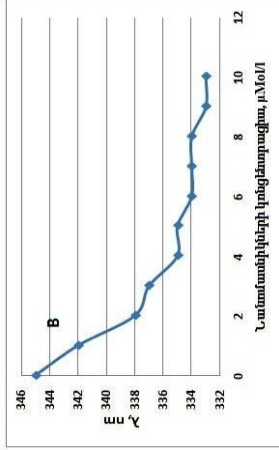
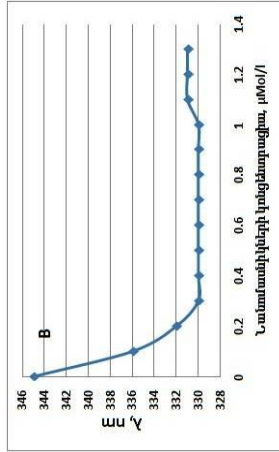
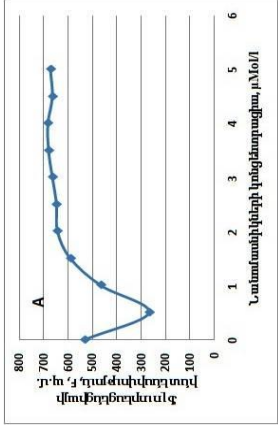
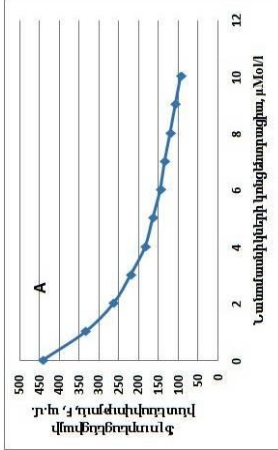
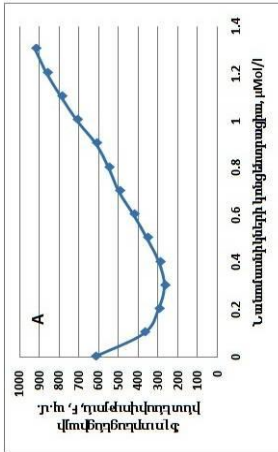
Ֆլուորեսցենցիայի մեթոդով MLO ֆոսֆոլիպազ A2-ի կոնֆորմացիաների փոփոխությունների ուսումնասիրությունը՝ նանոմասնիկների հետ փոխազդեցության ժամանակ

Փորձերի ընթացքում չափվել են Անդրկովկասյան գյուրգայի թույնից ստացված ֆոսֆոլիպազ A2 ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրները՝ երրորդ սերնդի AE2G3 ֆոսֆորային դենդրիմերների, երկրորդ սերնդի jq153 ֆոսֆոր պարունակող անֆիֆիլ դենդրոնների, երկրորդ սերնդի BDAB27 արծաթե նանոմասնիկների հետ փոխազդեցություններից առաջ և հետո: BDAB27 ունի-NMe3Cl և-PEG ֆունկցիոնալ խմբեր: Հարկ է նշել, որ տվյալ մասնիկները չունեն սեփական ֆլուորեսցենցիա, հետևաբար դրանց կոնցենտրացիոն կախվածությունը անդրկովկասյան գյուրգայի ֆոսֆոլիպազ A2-ի ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության փոփոխության հետ բացատրվում է բացառապես փոխազդեցության խորությամբ և ուժգնությամբ (Նկար 1):

Փորցերի իրականացման արդյունքում ցույց է տրված, որ անդրկովկասյան գյուրգա *Macrovipera lebetina obtusa*-ի և ցլի ենթաստամոքսային գեղձի թույնից ae2g3 ֆոսֆոր դենդրիմերների, jq153 ամֆիֆիլային դենդրոնների և BDAB27 արծաթե նանոմասնիկների փոխազդեցությունը հանգեցնում է սպիտակուցների կոնֆորմացիոն վիճակի փոփոխության՝ քրոմոֆորների սպիտակուցների հիդրոֆորային շրջակայք թողափոխմամբ: Պարզվել է, որ A2 ֆոսֆոլիպազի ինկուբացիան՝ դենդրիմերների ae2g3 նանոմասնիկներով, jq153 դենդրոններով, BDAB27 արծաթե նանոմասնիկներով և դեզինտեգրին օբտուսատախինով, հանգեցնում է համալիրների ձևավորմանը: Ընդ որում, ֆոսֆոլիպազ A2-ով և արծաթե նանոմասնիկների BDAB27 լուծույթներով նմուշներն աչքի են ընկնում մոնոդիսպերսությամբ:

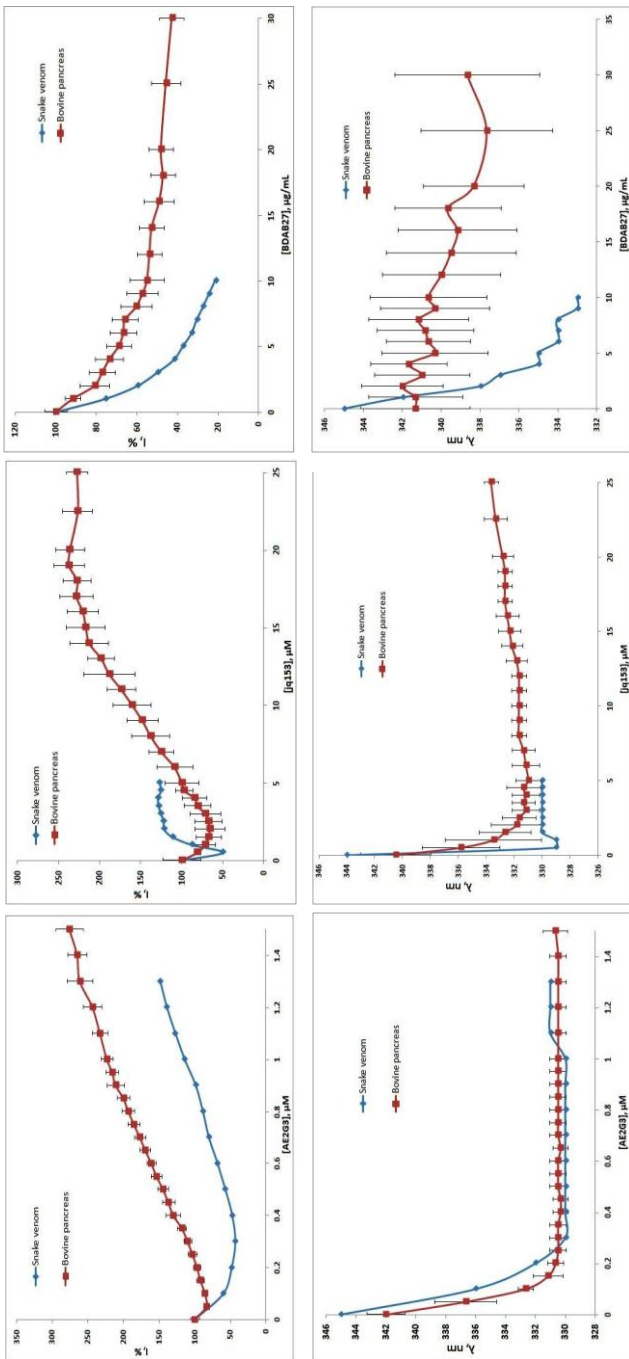
MLO և ցլի ենթաստամոքսային ֆոսֆոլիպազ A2-ի կոնֆորմացիաների փոփոխությունների համեմատական վերլուծությունը՝ նանոմասնիկների հետ փոխազդեցության ժամանակ

Ցլի ենթաստամոքսային գեղձի Ֆոսֆոլիպազ A2-ի փոխազդեցությունը AE2G3 դենդրիմերի հետ հետազոտվել է 0.8–25.0 մկգ/մլ կոնցենտրացիաների միջակայքում, jq153 դենդրիմերի հետ 3.0–150,0 մկգ/մլ կոնցենտրացիաների միջակայքում, BDAB27 արծաթե նանոմասնիկների 1,0–30,0 մկգ/մլ կոնցենտրացիաների միջակայքում: Նկար 2-ը ցույց է տալիս, որ սպիտակուցների Ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրի պարամետրերը (սպեկտրի առավելագույն ինտենսիվությունը (I_{max}) և դրան համապատասխան ալիքի երկարությունը (λ_{max}) նանոմասնիկների հետ փոխազդեցությունից առաջ և հետո փոփոխվում են: Այսպես, սպիտակուցին AE2G3 ավելացնելիս, դենդրիմերի կոնցենտրացիայի աճին զուգընթաց նկատվում է ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության աճ՝ կոնցենտրացիայի ամբողջ հետազոտվող միջակայքում, որի առավելագույն տեղաշարժը կարճալիք շրջանում 340,1±3,7 նմ-ից մինչև 330,4±0,1 նմ է՝ հետազոտվող կոնցենտրացիաների միջակայքում:



Նկար 1. AE2G3 դենդրիմերների և jգ153 սաֆիֆիլ դենդրոնների և BDAB27 արծաթե նանոասսիկների ադրեցությունը անդրկովկասյան գյուրգալի ֆոսֆոլիպազ A2-ի ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության (A) և ֆլուորեսցենցիայի էմիսիայի պիկերի (B) վրա

($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$, $5 \mu\text{g/mL PLA}_2$, *Tris-HCl buffer, pH 8.0*, 25°C):



Նկար 2. Անողիովկապան ցուրդայի և ցլի ենթաստամոքսային գեղձի ֆոսֆոլիպազ A2-ի Ֆլուրեսցենցիայի սպեկտրների ինտենսիվության (վերին շարք) և էլիսիայի պիկերի (ստորին շարք) համեմատական անալիզ՝ AE2G3 դեդորիմերների, յգ 153 ասֆիֆիլ դենդրոնների և BDAB27 արծաթե նանոսանիկների կոնցենտրացիայից կախված:
MLO ֆոսֆոլիպազի A2-ի կոնցենտրացիան այստեղ 50մկգ/մլ, իսկ ցլի ենթաստամոքսային գեղձից ստացված ֆոսֆոլիպազի A2-ի եր 5մկգ/մլ; 0.08U տրիս-HCl բուֆեր; pH 8,0; ֆոսֆոլիպազ A2-ի ինկուբացիայի ժամանակը նանոսանիկների հետ՝ 5ր; $\lambda_{ցրդ}$ =270 նմ; ջերմաստիճանը՝ 25°C:

ֆոսֆոլիպազ A2-ի ֆլուորեսցենցիայի պարամետրերի կախվածությունը միջավայրում յՁ153 դենդրոնների պարունակությունից, նման է AE2G3-ի վերը նշված ազդեցության:

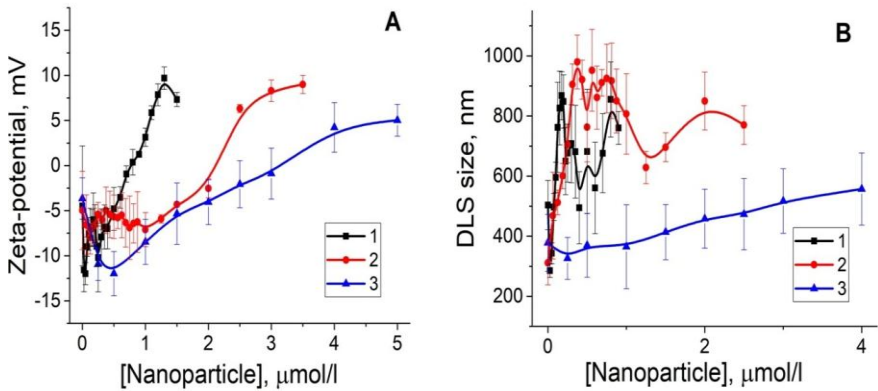
Սպիտակուցի ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը աճում է ինկուբացիայի միջավայրում յՁ153 դենդրոնների պարունակության աճին համընթաց և տեղի է ունենում մաքսիմումի տեղաշարժ կարճալիքային տիրույթ՝ 332,0±0,1 նմ չափով: Սպիտակուցի լուծույթում BDAB27 արծաթե նանոմասնիկների ներմուծման դեպքում կոնցենտրացիաների վերոնշյալ միջակայքում նկատվել է ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության նվազում և կարճալիքային տիրույթում սպիտակուցների լուսարձակման մաքսիմումի տեղաշարժ՝ մինչև 338,0±0,6 նմ կոնցենտրացիաների հետագոտվող միջակայքում:

Վերլուծելով օձի թույնի ֆոսֆոլիպազի A2-ի ֆլուորեսցենցիայի պարամետրերի փոփոխությունը նանոմասնիկների հետ փոխազդեցության ժամանակ, կարելի է նշել այն փաստը, որ սպիտակուցի ֆլուորեսցենցիայի I_{max} և λ_{max} կախվածության կորերը հաստատուն արժեքի են հասնում նանոմասնիկների ավելի ցածր կոնցենտրացիաների ժամանակ, քան ցլի ենթաստամոքսային գեղձի սպիտակուցի դեպքում: Օբտուսատիների ազդեցության ուսումնասիրությունը ֆոսֆոլիպազի A2-ի կոնֆորմացիաների վրա տրիպտոֆանային ֆլուորեսցենցիայի մեթոդով հնարավոր չդարձավ, քանի որ օբտուսատիների ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը զգալիորեն ավելի մեծ էր, քան ֆոսֆոլիպազի A2-ինը: Այսպիսով, հիմնվելով ստացված տվյալների վրա, կարելի է պնդել այն, որ անդրկովկասյան գյուրզա՝ *Macrovipera lebetina obtusa* օձի թույնից և ցլի ենթաստամոքսային գեղձից ստացված ֆոսֆոլիպազի A2-ի փոխազդեցությունը AE2G3 ֆոսֆորային դենդրիմերների, յՁ153 ֆոսֆոր պարունակող ամֆիֆիլ դենդրենների և BDAB27 արծաթե նանոմասնիկների հետ հանգեցնում է սպիտակուցների կոնֆորմացիոն վիճակի փոփոխություն՝ սպիտակուցների քրոմաֆորների հիդրոֆոր միջավայր տեղափոխմամբ:

ֆոսֆոլիպազ A2-ի ձեռա-պոտենցիայի վերլուծությունը օբտուսատիին դեզինտեգրինի և նանոմասնիկների հետ փոխազդեցության ժամանակ

Ձեռա-պոտենցիայի մեծությունը բնութագրում է նանոմասնիկների մակերեսային գումարային լիցքը: Ինչպես երևում է նկար 3-ից, փորձարկվող սպիտակուցի ձեռա-պոտենցիայը 0.1-5.0 մկգ/մլ կոնցենտրացիայի միջակայքում օբտուսատինով տիրելու դեպքում, դեզինտեգրինի մինիմալ կոնցենտրացիայի դեպքում նվազում է մինչև -19,4±1,4մՎ, որից հետո հասնում է -15,9±0,65մՎ արժեքի, և պահպանվում է այդ անկարդակում հետագոտվող ամբողջ միջակայքում: Ֆոսֆոլիպազ A2-ի և AE2G3 դենդրիմերների փոխազդեցության ուսումնասիրման ժամանակ սպիտակուցի ձեռա-պոտենցիայը 0,4-23,6 մկգ/մլ միջակայքում դենդրիմերներով տիրելու դեպքում, նանոմասնիկների մինիմալ քանակության պայմաններում, նվազում է մինչև -11,5±2,42 մՎ, որից հետո ձեռա-պոտենցիայի արժեքը հասնում է +11,7±1,25 մՎ-ի՝ 22,0 մկգ/մլ դենդրիմերի պարունակության համապատասխան: Ինչպես ցույց տվեցին հետագոտությունները, ֆոսֆոլիպազ A2-ի և յՁ153 դենդրոնների փոխազդեցության ժամանակ սպիտակուցի մոլեկուլների ձեռա-պոտենցիայի մեծությունը նանոմասնիկների պարունակության տարբեր

կոնցենտրացիաների դեպքում 0,4-20,0 մկգ/մլ միջակայքում սկզբում նվազում է մինչև $-6,5 \pm 3,33$ մՎ, այնուհետև աճում է մինչև $+8,3 \pm 1,2$ մՎ, դենդրոնների պարունակության 22,0 մկգ/մլ-ի հասնելիս:



Նկար 3. AE2G3 դենդրիմեր 1-ի, յգ153 ամֆիֆիլային դենդրոն 2-ի և PEG-իլացված BDAB27 արծաթե նանոմասնիկ 3-ի ազդեցությունը գետա-պոտենցիալի և DLS չափսերի վրա:

BDAB27 արծաթե նանոմասնիկների հետ փոխազդեցության ուսումնասիրման փուլում հետազոտվող սպիտակուցի մոլեկուլների ձեռա-պոտենցիալի մեծությունը նանոմասնիկներով տիտրման ժամանակ 0,25–10,0 մկգ/մլ կոնցենտրացիոն միջակայքում աճում է $-10,9 \pm 2,4$ մՎ-ից մինչև $+8,4 \pm 1,2$ մՎ: Ստացված տվյալների հիման վրա կարելի է եզրակացնել, որ A2 ֆոսֆոլիպազի ինկուբացիան սինթեզված նանոմասնիկներով, հանգեցնում է կոմպլեքսների ձևավորմանը:

Հարկ է նշել, որ Z-average size-ը հիդրոդինամիկական շափորոշիչ է և կարող է կիրառվել միայն դիսպերսիոն միջավայրի մասնիկների, կամ լուծույթում գտնվող մոլեկուլների նկատմամբ: Այս աշխատանքում Size peak պարամետրն արտացոլում է մասնիկների տրամագծի միջին արժեքը, որոնց քանակը միջավայրում գերակշռում է: Մոնոդիսպերս համակարգերի համար Z-Average size-ի և Size peak-ի երկու պարամետրերը կունենան նույն արժեքը: Պոլիդիսպերս համակարգերի դեպքում բաշխման գործառույթը կունենա պիկերի ավելի քան մեկ արժեք, որոնցից յուրաքանչյուրը կունենա տրամագծի իր միջին արժեքը և մասնիկների ընդհանուր թվի տոկոսային հարաբերակցությունը:

Նկարներից երևում է, որ ավելի արտահայտված մոնոդիսպերս համակարգեր են հանդիսանում ֆոսֆոլիպազ A2-ը՝ BDAB27 արծաթե նանոմասնիկների ու օրտուստատինի առկայությամբ լուծույթները, քանի որ Z-Average size և Size peak չափորոշիչներն ունեն ամենամոտիկ արժեքները (Աղյուսակ 1): Նաև պոլիդիսպերսության պարամետրն այս էքսպերիմենտներում չի գերազանցել 20%-ը, ինչը նույնպես թույլ է տալիս բնութագրել համակարգը որպես մոնոդիսպերս: Ֆոսֆոլիպազ A2-ի՝ AE2G3 դենդրիմերներով և յգ153 դենդրոններով ինկուբացիայի

արդյունքում ստացված տվյալները վկայում են այն մասին, որ նմուշում առկա են տարբեր չափերի կոմպլեքսներ: Այդ դեպքում պոլիդիսպերսության չափորոշիչն ուներ 20%-ը գերազանցող արժեք, ինչը թույլ չի տալիս խոսել համակարգի մոնոդիսպերսության մասին:

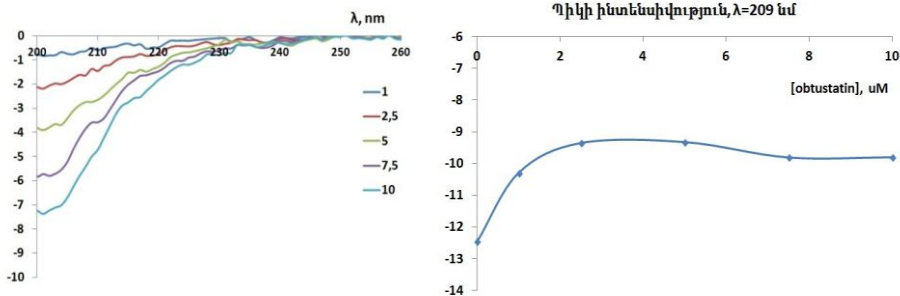
Աղյուսակ 1: Աշխատանքում օգտագործված լույսի դինամիկ ցրման մեթոդի չափորոշիչները: *Չափորոշիչների արժեքները ստացված են Հիլլի ֆունկցիայով մոդիֆիկացված փորձարարական կորերի ֆիթինգի արդյունքում:*

Նանոմասնիկներ	Z-average size*, նմ	Size peak, նմ	Zeta-potential, մՎ
AE2G3 դենդրիմերներ	4624±353	674±34	+11,7±1,25
jq153 ամֆիֆիլ դենդրոններ	3925±381	853±37	+8,3±1,2
BDAB27 արծաթե նանոմասնիկներ	1012±13	1102±364	+8,4±1,12
Օբտուստատին	1041±17	875±52	-15,9±0,65

Այդպիսով, ստացված տվյալների հիման վրա կարելի է հետևություն անել այն մասին, որ ֆոսֆոլիպազ A2-ի՝ AE2G3 դենդրիմերներով, jq153 դենդրոններով, BDAB27 արծաթե նանոմասնիկներով և օբտուստատին դեզինտեգրիմով ինկուբացիան հանգեցնում է կոմպլեքսների առաջացման: Ինչպես նաև ֆոսֆոլիպազ A2-ի և BDAB27 արծաթե նանոմասնիկների կամ օբտուստատինի խառնուրդներով ինկուբացված նմուշները բնութագրվում են մոնոդիսպերսությամբ:

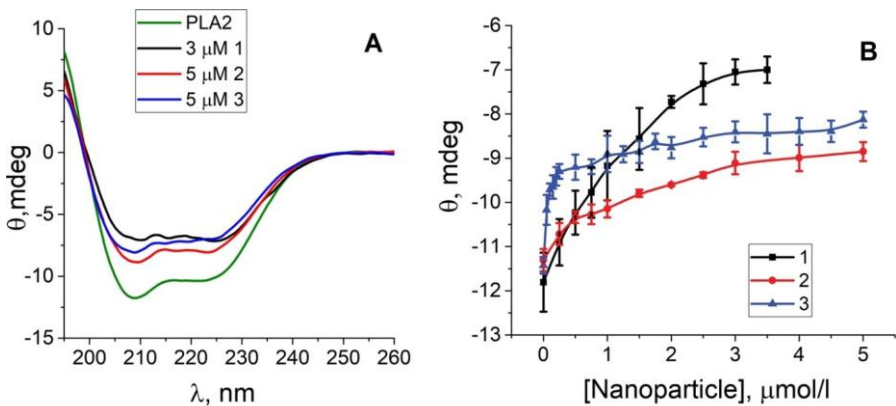
Շրջանային դիքրոիզմի մեթոդով ֆոսֆոլիպազ A2-ի երկրորդային կառուցվածքի ուսումնասիրությունը օբտուստատին դեզինտեգրինի և նանոմասնիկների հետ փոխազդեցության ժամանակ

Պարուրածև մոլեկուլները ցուցաբերում են շրջանային կրկնակի բեկում կամ օպտիկական ռոտացիա, ինչից էլ շրջակա միջավայրի բեկման ցուցանիշից կախված լույսի թափանցման արագությունը օպտիկական ակտիվ միջավայրում տարբեր կլինի: Այդ իսկ պատճառով, ձախակողմյան բևեռացված շրջանով լույսը կանցնի պարուրածև նմուշով, աջակողմյան բաղադրիչի համեմատ այլ արագությամբ: Երբ պարուրածև մոլեկուլը տարբեր աստիճանով է կլանում ձախակողմյան և աջակողմյան բևեռացված շրջանաձև լույսը, արդյունքում, էլեկտրական դաշտի վեկտորն Էլիպսաձև է լինում: Քանի որ գծային բևեռացված լույսը կարող է լինել հավասար ինտենսիվությամբ ձախակողմյան (ϵ_l) և աջակողմյան (ϵ_r) բևեռացված լույսի սուպերպոզիցիան, շրջանային բևեռացված լույսը անցնում է երկու ճառագայթները բեկող նյութով, շրջանային բևեռացված լույսի ալիքների երկարությունների միջև փուլային հարաբերակցությունը փոփոխվում է և գծային բևեռացված լույսը պտտվում է, իսկ էլիպսաձև բևեռացված լույսի հարթությունը թեքվում է: Էլիպսայնությունը (θ) որպես ալիքի երկարության ֆունկցիա որոշում է ՇԴ սպեկտրը (Նկար 4):



Նկար 4. Օբտուսատինի ՇԴ սպեկտրը (ձախից՝ էլիպտիկության ցուցանիշը, աջից λ_{210} սպեկտրները՝ կոնցենտրացիայից կախված):

Ֆոսֆոլիպազ A2-ի ՇԴ սպեկտրները նանոմասնիկների առկայության և բացակայության ժամանակ գրանցվել են ալիքի երկարության 200–260nm միջակայքում: Ֆոսֆոլիպազ A2-ի ՇԴ սպեկտրում էլիպտիկության ցուցիչի (θ) փոփոխությունը վերլուծել են 209nm մաքսիմալ տիրույթում ($\alpha \rightarrow \pi^*$ անցում): Ցույց է տրվել, որ ֆոսֆոլիպազ A2-ի ինկուբացիան նանոմասնիկների հետ հանգեցնում է θ ցուցիչի նվազման՝ սպեկտրի տվյալ հատվածում (Նկար 5):



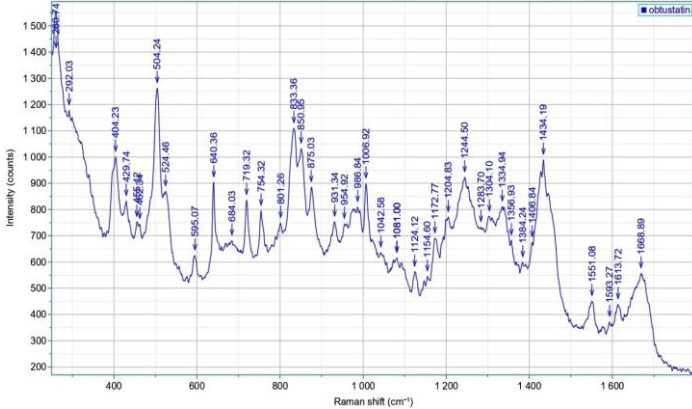
Նկար 5. Դենդրիմեր 1-ի, ամֆիֆիլային դենդրոն 2-ի և PEG-իլացված արծաթե նանոմասնիկ 3-ի ազդեցությունը Ֆոսֆոլիպազ A2-ի երկրորդային կառուցվածքի վրա (θ - էլիպտիկություն): (A – շրջանային դիքրոիզմի սպեկտրներ, B - $\lambda = 210 \text{ nm}$ ՝ 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ PLA2, Tris * HCl բուֆեր, pH 8.0, 25 °C սպայմաններում):

Այսպես, AE2G3 դենդրիմերների հետ փոխազդեցության ժամանակ θ ցուցիչը նվազել է $-11,5 \pm 0,85 \text{ mdeg}$ -ից (արժեքը ստուգիչում) մինչև $-5,84 \pm 0,52 \text{ mdeg}$, յգ153 դենդրոնների հետ՝ մինչև $-7,45 \pm 1,79 \text{ mdeg}$ արժեքը, BDAB27 արծաթե նանոմասնիկների հետ՝ մինչև $-5,80 \pm 10,63 \text{ mdeg}$, օբտուսատին դեզինստեգրիսի հետ՝ մինչև $-9,53 \pm 0,33 \text{ mdeg}$ արժեքը: θ ցուցիչի վերը նշված արժեքները ստացվել են Հիլլի (Hill) ֆունկցիայով մոդիֆիկացված փորձարարական կորերի ֆիթինգի արդյունքում: Տվյալները ցույց են

տալիս ֆոսֆոլիպազ A2 սպիտակուցի երկրորդային կառուցվածքի փոփոխությունները որպես վերը նշված նանոմասնիկների հետ կոմպլեքսային կառույցների առաջացման արդյունք:

MLO ֆոսֆոլիպազ A2-ի և օբտուսատստինի Ռաման սպեկտրների վերծանումը

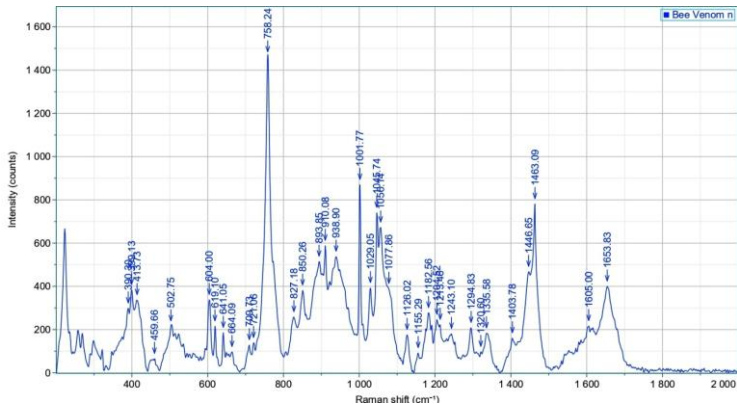
Ռամանի էֆեկտը (լույսի կոմբինացիոն ցրումը) արագ և բազմակողմանի գործիք է օժերի տքսինների բնութագրման համար: Օբտուսատստինի Ռաման-սպեկտրի ամիդ-III գոտին իրենից ներկայացնում է հարթության մեջ NH-ի ձկման, C-N-ի և C-C-ի ձգման խառնուրդ և հայտնվում է խիստ խառը վիբրացիոն ռեժիմների շրջանում: Այնուամենայնիվ, դեյտերիումի փոխանակումը տեղափոխում է ամիդ-III գոտին դեպի ավելի ցածր ալիքի տիրույթ մոտավորապես 1/2 գործակցով և թույլ է տալիս ճշգրիտ որոշել դրա դիրքը և ինտենսիվությունը: Երկրորդային կառուցվածքի գնահատումը ամիդ-I և ամիդ-III գոտիներում համապատասխանում է շրջանային դիքրոիզմի արդյունքներին: Չի նկատվում α -պարույրաձև կառուցվածք, իսկ կարբոնիլային ուժեղ ձգվող վիբրացիաները 1660 սմ⁻¹ և 1680 սմ⁻¹ տիրույթում վկայում են զգալի β -շրջադարձ և β -թերթի կառուցվածքների առկայության մասին:



Նկար 6: Օբտուսատստինի Ռաման սպեկտրը՝ ինֆրակարմիր լազերի կիրառմամբ:

Ամիդ-I-գոտում վերադրման պատճառով շրջադարձի և թերթիկի կառուցվածքի հարաբերակցությունը չի կարող ճշգրիտ որոշվել, բայց օգտագործելով C-H թեքումը մոտ 1440 սմ⁻¹ տիրույթում որպես ներքին ստանդարտ, օբտուսատստինի β -թերթի բաժինը գնահատվել է 20 % ավել ամիդ-III գոտուց 1240 սմ⁻¹ տիրույթում:

Օբտուսատստինում կան չորս դիսուլֆիդային կապեր, և դրանց կոնֆորմացիան H₂O-ում նույնպես ուսումնասիրվել է Ռաման սպեկտրոսկոպիայի միջոցով: Երկու S-S ձգվող հաճախականությունները տեսանելի են մոտ 504 սմ⁻¹ և 524 սմ⁻¹ տիրույթում մոտ 3:1 հարաբերական ինտենսիվությամբ: Ըստ Sugeta և այլոց (Նկար 6), ցածր հաճախականության վիբրացիան պատկանում է ամբողջովին գոշ կոնֆորմացիային, իսկ 530 սմ⁻¹ տիրույթում առկա գոտին տրանսգոշ-գոշ է:



Նկար 7: ֆոսֆոլիպազ A2-ի Ռաման սպեկտրը:

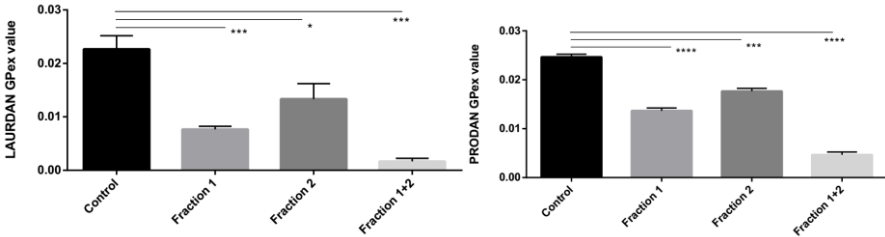
Հետաքրքիր է, որ ունենալով յոթ դիսուլֆիդային կապեր, ֆոսֆոլիպազ A2-ը չի առաջացնում այնպիսի բնորոշ պիկեր, որոնք կարող ենք տեսնել օբտուսատիների սպեկտրներում (Նկար 7): Սա կարող է վկայել այն մասին, որ ֆերմենտի ցիստեինները և՛ հետևաբար, դիսուլֆիդային կապերը գտնվում են հիդրոֆոբ միջավայրի մեջ բավականին խորը թաքնված, ինչպես նաև չունեն այնպիսի ազատության աստիճաններ, ինչպես դեզինտեգրիների կապերը, և այդ պատճառով ունակ չեն շեղել լազերի անդրադարձած լույսը: Ամեն դեպքում, տվյալ սպիտակուցի կառուցվածքը ևս վկայում է գերակշռող β -թերթային բնույթի մասին α -պարույրի տեղամասերի համեմատ:

Էրիթրոցիտների սավերների և լիպոսոմների վրա ֆոսֆոլիպազ A2-ի տարբեր իզոֆորմների մեմբրանոթրոպ ազդեցության ուսումնասիրություն

Չափվել են թաղանթի անիզոտրոպիայի ընդհանուր փոփոխությունները: ՊԸՈԴԱՆ և ԼԱՌԻԴԱՆ գոնդերի ացիլային մնացորդների տարբեր երկարությունների պատճառով ջրում և թաղանթում դրանց տեղաբաշխումը խիստ տարբեր է: ՊԸՈԴԱՆն ավելի զգայուն է բևեռայնության փոփոխությունների հանդեպ, որոնք տեղի են ունենում երկշերտ մակերևույթին ավելի մոտ, քան այն փոփոխությունների, որոնք ավելի խորն են և հայտնաբերվում են ԼԱՌԻԴԱՆով: GP մեթոդի առավելությունը նրանում է, որ այն չափազանց զգայուն է թաղանթի հատկությունների նկատմամբ, ինչպես նաև հնարավորություն է ընձեռում որոշել և քանակապես գնահատել թաղանթի ֆազային վիճակը:

Գյուրգայի թոյնից անջատվել է երկու ֆոսֆոլիպազային ֆրակցիա, որոնց 49-երորդ տեղամասում դասական ասպարտատ էր և ուսումնասիրվել է նրանց ազդեցությունը բնական մոդելային թաղանթների վրա, ինչպես նաև՝ դրանց սիներգիզմի աստիճանը համատեղ ազդեցության ժամանակ: Ինչպես երևում է նկար 8-ից երկու ֆրակցիաներն էլ զգալի փոխում են LAURDAN-ի գրգռման GP արժեքները ֆոսֆոլիպիդային GUV թաղանթում, տես նվազման աստիճանը տարբեր է տարբեր իզոֆորմների համար՝ 1-ին ֆրակցիամ ավելի շատ է փոխում թաղանթի

հոսելիության աստիճանը, քան 2-ը: Սակայն առավել ուշագրավ է այն փաստը, որ երկու ֆրակցիաների համատեղ ազդեցությունը թաղանթի մեջ ջրի ներթափանցման համար շատ կտրուկ ուժեղացնում է այդ պրոցեսը, թաղանթը դարցնելով գրեթե լիովին թափանցիկ հեղուկի համար:



Նկար 8. LAURDAN-ի և PRODAN-ի գրգռման GP արժեքները ֆոսֆոլիպիդային GUV թաղանթում ձևափոխված MLO օձի թույնից 1, 2 և 1+2 մեկուսացված ֆրակցիաներով (ինկուբացվել են 30 րոպե):

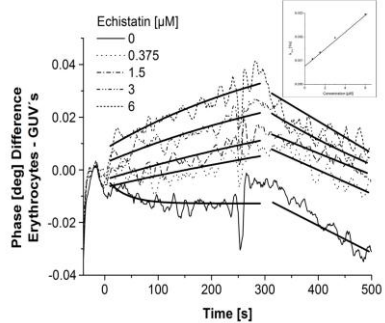
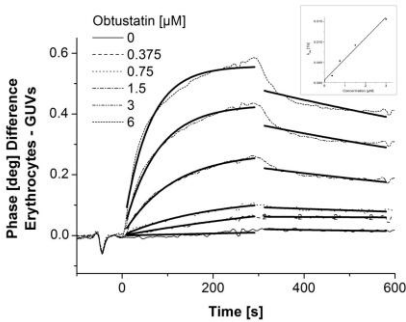
Վերջնական կոնցենտրացիան յուրաքանչյուր ֆրակցիայի և ընդհանուր PLA2s խառնուրդի համար եղել է 18 մկմ:

Նմանատիպ պատկեր ենք գրանցում նաև PRODAN-ի գրգռման GP արժեքների համար թեև ոչ այդքան դրամատիկ անկումով, ինչպես գրանցվում է LAURDAN-ի դեպքում: Հետաքրքիր է, որ երիթրոցիտար ստվերների թաղանթի GP արժեքներ գրեթե ընդհանրապես չէին փոփոխվում ստուգիչի համեմատ նշված զոնդերի ազդեցությամբ:

Ներկայիս աշխատանքում մենք հաշվարկել ենք նաև PRODAN-ի և LAURDAN-ի գրգռման GP արժեքները ֆոսֆոլիպիդային GUV թաղանթում ձևափոխված D49, K49, S49 տոքսիններով (ֆոսֆոլիպազ U2 իզոէնզիմներ՝ անջատված *Bothrops jararacussu*, *Vipera ursinii renardi* և *Macrovipera lebetina obtusa* օձերի թույներից՝ համապատասխանաբար), որոնք վկայում էին սովյալ տոքսինների կողմից թաղանթների հոսելիության փոփոխման տարբեր աստիճանի, սակայն բոլոր դեպքերում խիստ նվազելու պայմանով: Համեմատաբար ավելի քիչ նվազում է գրանցվել K49 տոքսինի փոխազդեցության ժամանակ, որը հայտնի է նաև իր էնզիմատիկ հատկությունների կորստով և դիմերային կառուցվածքով:

Դեզինտեգրինների թաղանթների հետ կապման կինետիկ պատկերը մակերեսային ձայնային ալիքների մեթոդով

Աշխատանքում օգտագործվել են երկու տիպի դեզինտեգրիններ. էքիստատինը, որի կապման ակտիվ կենտրոնում արգինին –գլիցին-ասպարտատ (RGD) հաջորդականությունն է և օբտուսատինը, որը կազմված է 41 ամինոթթվային մնացորդներից և չորս զույգ երկսուլֆիդային կապերից և հանդիսանում է կոլագեն IV-ի (IC₅₀ = 0.8 nM) α1β1 ինտեգրինի յուրահատուկ արգելակիչ: Բջջային ռեցեպտորների հետ կապման ակտիվ կենտրոնը օբտուսատինի մոտ բաղկացած է լիզին-թրեոնին-սերին (KTS) հաջորդականությունից:



Նկար 9. Ղեզինտեգրինների կապումը էրիթրոցիտար սովերնների թաղանթի հետ տարբեր կոնցենտրացիաներով:

Վերին աջ անկյունում կապման կինետիկ կորերն են, որի դիսցազիայի հավասարակշռության հաստատունի առժեքները բերված են Աղյուսակ 2-ում: Այս հավասարման գրաֆիկը կոնցենտրացիայի (նանոմոլերով) կորդինատներով $k(1/s)$ իրենից ներկայացնում է ուղիղ, որտեղ՝ թեքման անկյան տանգենտը համապատասխանում է լիզանդի և ռեցեպտորի խնամակցության հաստատունին (K_D):

Փորձարկումների շարքը իրականացվել է բիոսենսորի մակերևույթին տեղադրված սուբստրատների վրա (այստեղ ՀՄՎ-ները հանդիսացել են էրիթրոցիտների թաղանթների համար նեգատիվ ստուգիչ, քանի որ ցուրկ են ինտեգրիններից), իսկ դեզինտեգրինները լվանում էին նրանց մակերևույթը շարժական փուլում (Նկար 9): Տեղի է ունեցել բավականին ակնհայտ սուբստրատի հետ դեզինտեգրինների կապում, ինչը թույլ է տվել չափել գործընթացի կինետիկ սովալները իրական ժամանակում (k_{on} , k_{off} , K_D): Այս դեպքում օբտուստատինի դիսցազիայի հավասարակշռության հաստատունը K_D -ն ընկած է նանոմոլյարային արժեքների միջակայքում, իսկ էլիստատինինը՝ միկրոմոլյարային: Քանակային առումով դա նշանակում է, որ օբտուստատինի կապումը թաղանթի հետ մի կարգ բարձր է, քան էլիստատինը: Այս տեսակի լիզանդ-սուբստրատ փոխհարաբերությունների ժամանակ դիտարկվում է կապման 1:1 մոդելը, որը նկարագրվում է Սկետչարդի հավասարումով ազատ և կապված լիզանդի կոնցենտրացիաների հարաբերության տեսքով (Աղյուսակ 2):

Աղյուսակ 2. Ղեզինտեգրինների հետ էրիթրոցիտների թաղանթների կապման կինետիկական սովալները

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

Ղեզինտեգրինների հակաադիեզիոն հատկությունների ուսումնասիրությունը տարբեր բջջային համակարգերում

Montivipera raddei, *Vipera ursinii renardi* թույլների տարբեր դեզինտեգրինային ֆրակցիաների և օբտուստատինի հակաադիեզիոն հատկությունները

ուսումնասիրվել են PC12, MCF7 բջիջների և սպիտակուցային արտաբջջային մատրիքսի (կոլլագեն, ֆիբրոնեկտին) փոխազդեցությամբ: Կատարված փորձերի արդյունքները ցույց են տվել, որ օբտուսատիները առավել արդյունավետ կերպով արգելակում է բջիջների ադիզզիան կոլլագենային մակերեսի վրա, ինչը համահունչ է նախկինում նկարագրված օնկոստատիկ անգիոգենեզի արգելակմանը, որի հիմքում էլ ամենայն հավանականությամբ ընկած է էնդոթելային բջիջներում $\alpha 1 \beta 1$ ինտեգրինի արգելակումը: Զգալի հակաադիզզիոն հատկություններն ցուցաբերել նաև Հայկական իժի թոյնից անջատված դեզինտեգրինային ֆրակցիաները:

Եզրակացություններ

1. Հետևություն է արվել այն մասին, որ անդրկովկասյան գյուրգայի՝ *Macrovipera lebetina obtusa* թոյնի և ենթաստամոքսային գեղձի ֆոսֆոլիպազ A2-ի ու ֆոսֆորային դենդրիմերների, ֆոսֆոր պարունակող ամֆիֆիլային դենդրոնների և արծաթե նանոմասնիկների փոխազդեցությունը բերում է սպիտակուցների կոնֆորմացիոն վիճակի փոփոխության՝ սպիտակուցների քրոմոֆորների հիդրոֆորային միջավայր տեղափոխմամբ:
2. Ցույց է տրվել, որ A2 ֆոսֆոլիպազի ինկուբացիան վերը նշված նանոմասնիկներով հանգեցնում է կոմպլեքսների առաջացման: Ընդ որում, BDAB27 արծաթե նանոմասնիկներով կամ օբտուսատիներով և A2 ֆոսֆոլիպազի լուծույթով նմուշները բնութագրվում են մոնոդիսպերսությամբ:
3. Ռաման սպեկտրները վկայում են ուսումնասիրվող նյութերում α -պարուրի տեղամասերի գրեթե լիովին բացակայության մասին, ի տարբերություն β -շրջադարձ և β -թիթեղային կառուցվածքների, ինչպես նաև ֆոսֆոլիպազներում դիսուլֆիդային կապերի խորքային դիրքավորման մասին՝ ի տարբերություն օբտուսատիների: Կատարված փորձերի արդյունքում ցույց է տրվել նաև, որ ֆոսֆոլիպազ A2-ի փոխազդեցությունը նանոմասնիկների հետ հանգեցնում է նրա երկրորդային կառուցվածքի կարգի խախտման:
4. Բացահայտվել է ֆոսֆոլիպազ A2 տարբեր իզոկոմպլեքսների սինթեզիկ ազդեցությունը թաղանթային երկշերտի վրա ինչպես մեկ օձի թոյնի իզոֆորմների համար, այնպես էլ՝ տարբեր օձերի թոյններից անջատած իզոֆորմների համատեղ ազդման ընթացքում:
5. Պարզվել է, որ Հայկական իժի թոյնը պարունակում է տոքսիններ, որոնք համագործակցում են ալֆա1բետա1-տիպի ինտեգրինային ռեցեպտորների հետ, թեև օբտուսատիները շատ ավելի արդյունավետ է ճնշում PC12 բջիջների ադիզզիան կոլլագենի ծածկույթի վրա: Հայկական իժի դեզինտեգրինային ֆրակցիաները ունակ են ճնշել ինչպես U73-ով և ռիստոցետիմով, այդպես էլ թրոմբինով առաջացրած թրոմբոցիտների ագրեգացիան, ի տարբերություն օբտուսատիների և նույն թոյնից անջատված C-տիպի լեկտինանման սպիտակուցների:

Ատենախոսության թեմայով տպագրված աշխատությունների ցուցակ

1. Ayvazyan N., Ghukasyan G., Ghulikyan L., Kirakosyan G., Sevoyan G., Voskanyan A., Karabekyan Z. The Contribution of Phospholipase A2 and Metalloproteinases to the Synergistic Action of Viper Venom on the Bioenergetic Profile of Vero Cells.// *Toxins* 2022, 14, p.724 .
2. Terehova M., Dzitruk V., Abashkin V., Kirakosyan G., Ghukasyan G., Bryszewska M., Pedziwiatr-Werbicka E., Ionov M., Gómez R., Javierde La Mata F., Mignani S., Shi X., Majoral JP., Sukhodola A., Shcharbin D. Comparison of The Effects of Dendrimer, Micelle and Silver Nanoparticles on Phospholipase A2 Structure. // *J. of Biotechnology*, V. 331, 2021, p. 48-52.
3. Kishmiryan, A., Ghukasyan G., Ghulikyan L., Darbinyan A., Parseghyan L., Voskanyan A., Ayvazyan N. The Development and Evaluation of the Efficacy of Ovine Derived Experimental Antivenom Immunoserum Against *Macrovipera lebetina obtusa* Venom.//*J. Venom Res*, 2021, Vol 11, p. 7-15.
4. Гукасян Г.В., Казарян Н.А., Айвазян Н.М. Поверхностные Акустические Волны и Их Применение в Биомедицинских Исследованиях. // Сб. Трудов “Молодые Ученые В Биологии И Медицине: Международная Научно-Практическая Конференция”, Сочи, РФ, 18-19 Апр. 2019 г., с. 163-169.
5. Ghulikyan L., Mohamadvarzi M., Ghukasyan G., Kishmiryan A., Zaqaryan N., Kirakosyan G., Ayvazyan N. Molecular Events Associated With *Vipera latifi* Venom Effect On Condition Of Human Red Blood Cells.// *Proceedings of the Yerevan State University*, 2016, № 2, p. 43-50.
6. Ghukasyan G. Blood Groups In Toxinology And Reactive Oxygen Species Generation. // *New Med. Journal*, 2022, V.LXII, N2, p. 92-100.

Թեզիսներ

1. Ayvazyan N., Ghukasyan G., Ghulikyan L., Kirakosyan G., Sevoyan G., Voskanyan A., Karabekyan Z.. The Contribution Of Phospholipase A2 And Metalloproteinases To The Synergistic Action Of Viper Venom On The Bioenergetic Profile Of Vero Cells. // *Euven-2021*, Abstract Book, p.45, <https://www.Euven-Congress.Eu/Doc/Book-Euven.pdf>
2. Ayvazyan N., Kishmiryan A., Ghulikyan L., Ghukasyan G.. Engineering And Design For Next-Generation Antivenoms Against Viperidae Snakebites. // *Biotechnology-Spib-2021*, Abstract Book, p.16. http://Biotechnology-Spib-2021.Com/Wp-Content/Uploads/2021/10/Armbiotech-Spib-2021-Proceedings_Abstacts.pdf
3. Ayvazyan N., Ghukasyan G., Ghulikyan L., Kishmiryan A. Blood Groups In Toxinology And Antivenomics. // 11th Asia-Pacific Congress Of The International Society On Toxinology, 1st - 5th November 2021, Cairns, Australia, p.49.
4. Kishmiryan A., Ghukasyan G., Ghulikyan L., Darbinyan A., Voskanyan A., Ayvazyan N. The Development And Evaluation Of Efficacy Of Animal Derived Monovalent Antivenom Against *Macrovipera lebetina obtusa* Venom.// International Conference On Biotechnology And Health 2020, Russian-Armenian University, Yerevan, Armenia, October 29-31, 2020, p.88.
5. Ayvazyan N., Ghukasyan G., Ghulikyan L., Sevoyan G., Phospholipase A2 From *Macrovipera Lebetina Obtusa* Venom Shift Cellular Bioenergetics To A More Oxidative And Glycolytic Phenotype. // *Febs Open Bio*, V.11, Issue S1: Supplement 45th FEBS Congress,

Entitled “Molecules Of Life: Towards New Horizons“, July 3- 8, 2021, Ljubljana, Slovenia., p. 366. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13205>

6. Гукасян Г.В., Гуликян Л.А., Айвазян Н.М. Противоопухолевое воздействие дизинтегринов из ядов гадюк на *in vivo* и *in vitro* моделях опухолей. // Материалы XVI всероссийского совещания с международным участием и IX школе по эволюционной физиологии, посвященных памяти академика Л.А. Орбели», 19-24 октября, Санкт-Петербург, РФ, Журнал эволюционной биохимии и физиологии, 2020, 56 (7), с. 568.
7. Kirakosyan G., Tadevosyan H., Ghulikyan L., Ghukasyan G., Ayvazyan N. The Comparison Of *Montivipera raddei* And *Macrovipera lebetina obtusa* Viper Venoms Effects On Human Erythrocyte Membrane ATPase Activites. //Toxicon Special Issue: EU-IST2018, Yerevan, Armenia, 22-26 Sep, 2018; Volume 159, Suppl. 1, 2019, p. 30.
8. Ghukasyan G., Mohamadvarzi M., Kirakosyan G., Ghulikyan L., Ayvazyan N. Morphological And Functional Alteration Of Human Erythrocytes Caused By Some Iranian Vipers' Venom. Toxicon Special Issue: EU-IST2018, Yerevan, Armenia, 22-26 Sep, 2018; Volume 159, Suppl. 1, 2019, p.31.
9. Terzyan D., Kishmiryan A., Ghukasyan G., Meltonyan A., Ayvazyan N., Manvelyan L. Neurotoxic Effect Of *Macrovipera lebetina obtusa* And *Montivipera raddei* Snake Venoms On Rats Neuromuscular Junction (Nmj). Toxicon Special Issue: EU-IST2018, Yerevan, Armenia, 22-26 Sep, 2018; Volume 159, Suppl. 1, 2019, p.20.
10. Ghukasyan G, Ayvazyan N., Ghazaryan N. Erythrocytes Ghost Receptors Interaction With Disintegrin Investigated By Surface Acoustic Waves Technique. Febs Journal, 2017, 284 (Suppl. 1), p. 183-184.
11. Айвазян Н.М., Казарян Н.А., Гуликян Л.А., Кишмирян А.В., Гукасян Г.В., Исследование Противоопухолевого Воздействия Дизинтегрин Обтустатина Из Яда Закавказской Гюрзы (*Macrovipera lebetina obtusa*) На Мышах С Саркомой Крокера(S-180), «Успехи Молекулярной Онкологии», 2016, Т.3, N4, с. 70.

Биофизические аспекты действия фосфолипаз A2 и дезинтегринов яда гадюк

Резюме

Ключевые слова: фосфолипаза A2, змеиный яд, обтустатин, наночастицы, дезинтегрины.

Объектами исследования являлись фосфолипаза A2 и дезинтегрины змеиных ядов, в частности – обтустатин яда закавказской гюрзы.

Целью работы являлось установление изменений вторичной структуры и конформации фосфолипазы A2 и обтустатина при их взаимодействии с наночастицами в различных условиях.

Методы исследования — флуоресцентная спектроскопия и расчет значений генеральной поляризации, спектроскопия кругового дихроизма, динамическое рассеяние света, фосфоресценция в микросекундном диапазоне, Рамановская спектроскопия, биосенсоры на базе поверхностных акустических волн.

Полученные результаты и их новизна. В работе показано, что взаимодействие фосфолипаз A2 из яда закавказской гюрзы *Macrovipera lebetina obtusa* и поджелудочной железы быка с фосфорными дендримерами AE2G3, фосфоросодержащими амфифильными дендронами jq153 и серебряными наночастицами BDAB27 приводит к изменению конформационного состояния белков с переводом хромофоров белков в гидрофобное окружение. Установлено, что инкубация фосфолипазы A2 с наночастицами дендримеров, дендронами и серебряными наночастицами приводит к формированию комплексов. При этом, образцы растворов фосфолипазы A2 с серебряными наночастицами BDAB27 или обтустатином характеризуются моодисперсностью. В результате проведенных экспериментов показано, что фосфолипаза A2 хорошо аппроксимируется суммой двух экспонент с различными временами жизни быстрой и медленной компонент. Бизэкспоненциальность кинетической кривой затухания фосфоресценции белка можно объяснить существованием двух пулов хромофоров, отличающихся разной доступностью водному растворителю. Показано, что взаимодействие фосфолипазы A2 с наночастицами приводит к нарушению порядка ее вторичной структуры.

Показано, что изоформы фосфолипазы A2 из ядов змей наделены синергизмом воздействия на липидные мембраны (гигантские липосомы и эритроцитарные тени) и на функционирование белковых мембранных систем (АТФазные комплексы).

Изолированный из MLO яда, обтустатин является самым коротким известным мономерным дезинтегрином змеиного яда и специфическим ингибитором $\alpha 1\beta 1$ интегрин. Этот пептид имеет потенциальное терапевтическое влияние на прогрессирование опухолей, которое связано с ингибированием ангиогенеза. Анализ данной активности проводился в сравнение с другими видами дезинтегринов (других коротких, длинноцепочечных и димерных).

Для исследования воздействия дезинтегринов на модельные мембраны применялся метод исследования белок-липидных взаимоотношений посредством поверхностных акустических волн. Серию проводили при иммобилизованных на поверхности биосенсора субстратах (ГУВ-ы и тени эритроцитов), а дезинтегрины (обтустатин и эхистатин) омывали их поверхность в мобильной фазе. Эхистатин был выбран для сравнения, т.к. наиболее близок к обтустатину по последовательности аминокислотных остатков и вторичной структуре, однако принципиально отличается от обтустатина по последовательности аргинин-глицин-аспартат (RGD вместо KTS у обтустатина) в активном центре связывания. Имело место очевидное связывание дезинтегринов с субстратом, с константой равновесия диссоциации обтустатина в наномолярной области значений, а эхистатина - в микромолярной, что означает, что обтустатин связывается с мембраной в концентрации на порядок выше, чем эхистатин.

Антиадгезивные свойства дезинтегринов изучались по взаимодействию клеток РС12 (нейроэндокринные клетки опухоли мозгового слоя надпочечников крысы) и MCF7 с белковыми внеклеточными матриксами (коллаген и фибронектин). Так, адгезия клеток РС12 к коллагеновому покрытию ингибируется коротким дезинтегрином обтустатином и обусловлена наличием интегринового рецептора. С использованием этой модели нами установлено, что в яде гадюки Радде также содержатся токсины, взаимодействующие с интегриновыми рецепторами $\alpha\beta 1$ -типа. С использованием теста по адгезии клеток MCF7 на фибронектин проверена активность фракций яда *V. ursinii*. Установлено, что фракции II и III ингибируют адгезию, однако интересно, что RGD-содержащий дезинтегрин битистатин не обладает такой способностью.

Исследование влияния фракций яда гадюки Радде на агрегацию тромбоцитов выявила токсины, оказывающие различные эффекты в зависимости от природы индуктора агрегации. Так, фракция, содержащая согласно данным масс-спектрометрии белок, подобный лектину С-типа, ингибировала агрегацию, индуцированную АДФ и ристоцетином, но не тромбином. Фракция же, содержащая дезинтегрин, ингибировала агрегацию, вызванную всеми упомянутыми индукторами, как и битистатин из яда *V. ursinii*. Обтустатин, будучи высокоспецифичным ингибитором именно $\alpha\beta 1$ коллагенового рецептора, не оказывал влияния на агрегацию тромбоцитов.

Таким образом, MLO яд и его компоненты (фосфолипаза A2 и обтустатин) являются биологически активными веществами со специфическими структурно-функциональными особенностями, которые могут внести значительный вклад в разработку прототипов лекарств для ряда патологий и таргетинга в сочетании с наночастицами.

Biophysical aspects of the action of phospholipases A2 and disintegrins from vipers' venom

Summary

Keywords: phospholipase A2, snake venom, obtustatin, nanoparticles, disintegrins

The objects of the study were phospholipase A2 and disintegrins of snake venoms, in particular, obtustatin of the venom of the Transcaucasian gyurza.

The aim of this work was to establish changes in the secondary structure and conformation of phospholipase A2 and obtustatin during their interaction with nanoparticles under various conditions.

Research methods — fluorescence spectroscopy and calculation of general polarization values, circular dichroism spectroscopy, dynamic light scattering, phosphorescence in the microsecond range, Raman spectroscopy, biosensors based on surface acoustic waves.

The results obtained and their novelty. It was shown that the interaction of phospholipases A2 from the venom of the Transcaucasian viper *Macrovipera lebetina obtusa* and bovine pancreas with AE2G3 phosphorus dendrimers, jql153 phosphorus-containing amphiphilic dendrons, and BDAB27 silver nanoparticles leads to a change in the conformational state of proteins with the transformation of protein chromophores into a hydrophobic environment. It was found that the incubation of phospholipase A2 with dendrimer nanoparticles, dendrons, and silver nanoparticles leads to the formation of complexes. At the same time, samples of solutions of phospholipase A2 with silver nanoparticles BDAB27 or obtustatin are characterized by monodispersity. As a result of the experiments performed, it was shown that phospholipase A2 is well approximated by the sum of two exponents with different lifetimes of the fast and slow components. The biexponentiality of the protein phosphorescence decay kinetic curve can be explained by the existence of two pools of chromophores differing in their different accessibility to an aqueous solvent. It has been shown that the interaction of phospholipase A2 with nanoparticles leads to a violation of the order of its secondary structure.

Phospholipase A2 isoforms from snake venoms have been shown to have a synergistic effect on lipid membranes (giant liposomes and erythrocyte shadows) and on the functioning of protein membrane systems (ATPase complexes).

Isolated from MLO venom, obtustatin is the shortest known monomeric snake venom disintegrin and a specific inhibitor of $\alpha 1\beta 1$ integrin. This peptide has a potential therapeutic effect on tumor progression, which is associated with the inhibition of angiogenesis. The analysis of this activity was carried out in comparison with other types of disintegrins (other short, long chain and dimeric).

To study the effect of disintegrins on model membranes, the method of studying protein-lipid relationships by means of surface acoustic waves was used. The series was carried out with substrates immobilized on the surface of the biosensor (GUVs and erythrocyte ghosts), and disintegrins (obtustatin and echistatin) washed their surface in the

mobile phase. Echistatin was chosen for comparison because it is closest to obtustatin in amino acid sequence and secondary structure but fundamentally differs from obtustatin in the sequence of arginine-glycine-aspartate (RGD instead of KTS in obtustatin) in the active binding site. There was an obvious binding of disintegrins to the substrate, with the dissociation equilibrium constant of obtustatin in the nanomolar range of values, and echistatin in the micromolar range, which means that obtustatin binds to the membrane at a concentration an order of magnitude higher than echistatin.

The antiadhesive properties of disintegrins were studied by the interaction of PC12 cells (neuroendocrine cells of the rat adrenal medulla tumor) and MCF7 cells with protein extracellular matrices (collagen and fibronectin). Thus, the adhesion of PC12 cells to the collagen coating is inhibited by the short disintegrin obtustatin and is due to the presence of an integrin receptor. Using this model, we found that the venom of the *Vipera raddei* also contains toxins that interact with $\alpha 1\beta 1$ -type integrin receptors. The activity of *V. ursinii* venom fractions was tested using the MCF7 cell adhesion to fibronectin. Fractions II and III were found to inhibit adhesion, however, it is interesting that RGD-containing disintegrin bitistatin does not have this ability.

The study of the effect of fractions of the venom of the *Vipera raddei* on platelet aggregation revealed toxins that have different effects depending on the nature of the aggregation inducer. Thus, a fraction containing, according to mass spectrometry data, a protein similar to C-type lectin inhibited aggregation induced by ADP and ristocetin, but not by thrombin. The fraction containing disintegrin inhibited the aggregation caused by all the mentioned inducers, as well as bitistatin from *V. ursinii* hell. Obtustatin, being a highly specific inhibitor of the $\alpha 1\beta 1$ collagen receptor, had no effect on platelet aggregation

Thus, MLO venom and its components (phospholipase A2 and obtustatin) are biologically active substances with specific structural and functional features that can make a significant contribution to the development of drug prototypes for a number of pathologies and targeting in combination with nanoparticles.

