

РОЗРОБКА МЕТОДІВ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЦІЛЬОВИХ БІЛКІВ ОТРУТИ ЗМІЙ РОДУ *AGKISTRODON*

На основі отрути *Agkistrodon blomhoffi ussuriensis* розроблено комплекс методів вхідного контролю отрути змії роду *Agkistrodon*, який включає два етапи хроматографічного розділення цільної отрути та методи визначення біологічної активності цільових білків. З використанням методів було визначено вміст таких цільових білків: тромбінподібного ферменту, активаторів протромбіну та протеїну С, фібрин(ген)олітичного ферменту, інгібітора агрегації тромбоцитів та фосфоліпази А₂. Універсальність розробленого вхідного контролю отрути змії роду *Agkistrodon* було доведено шляхом задовільного його застосування для отрути видів *A. halys halys*, *A. acutus* та *A. brevicadus*. Наведено порівняльну характеристику декількох серій отрути *A. brevicadus*; вивчено цитотоксичність для всіх досліджуваних отрут; проведено порівняльну характеристику.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: отрута змії роду *Agkistrodon*, контроль якості, рідинна хроматографія, цитотоксичність.

ВСТУП. Одним із пріоритетних напрямків роботи пілотного або промислового підприємства, пов'язаного з виробництвом діагностикумів для системи гемостазу людини, є розвиток та вдосконалення системи контролю якості відповідно до стандартів GMP, це головна умова досягнення гарантії якості продукції [4, 21, 24, 25].

Якість сировини та методи її контролю є актуальним питанням будь-якого біотехнологічного виробництва та має свої особливості залежно від джерела сировини.

Предметом детального вивчення є вхідний контроль сировини, такої, як отрута змії, для біотехнологічного процесу, а саме етап визначення придатності конкретної партії (або серії) отрути для отримання цільових продуктів. Воочевидь, даний етап виробництва потребує розробки швидких та простих методів ідентифікації цільових білків. На прикладі виробництва декількох цільових білків з отрути змії розглянемо контроль якості цільної отрути роду *Agkistrodon* на вхідному етапі технологічного процесу.

На відміну від достатньо консервативних природних джерел біологічно активних речовин (рослини, плазма крові тощо) склад отрути змії суттєво залежить від багатьох факторів [14]. Такі фактори, як вік змії, ореол мешкання і, як наслідок, умови харчування, значно впли-

вають на кількісний та якісний вміст білків [8, 10]. Тому помилка вхідного контролю призводить до збільшення собівартості препаратів або неможливості виробництва фармпрепаратів із заданою якістю у задані строки.

Отрута змії роду *Agkistrodon* містить білки, важливі для діагностики гемостазу людини, потенційні фармацевтичні агенти або білки, що можуть бути використані як інструменти для досліджень. Ідентифікація таких білків у цільній отруті ускладнена їх протилежною біологічною дією або токсичними компонентами, тому для розробки принципів вхідного контролю сировини було запропоновано проводити двохетапне хроматографічне розділення білковопептидного складу цільної отрути із застосуванням методів визначення біологічної активності, специфічної для цільових білків, на кожному етапі фракціонування. Ми вважали, що такий підхід дозволить розділити антагоністичні цільові білки і визначити їх активності у досліджуваній отруті. Оскільки отрута змії є сильним токсином, визначення її цитотоксичності стало одним із необхідних етапів вхідного контролю [2].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Усі експериментальні роботи було проведено на базі біотехнологічного Center of Excellence НВП Shijir International Co. Ltd. (Монголія, Долина Дощів).

У роботі використовували хроматографи серії АКТА (АКТАexplorer, АКТАbasic) з програмою

UNICORN 5.01. Хроматографію проводили на упакованих колонках RESOURCE Q та сорбентах Superose 6, Superose 12, Superdex 75 та 200 PG (GE Healthcare AB, Швеція, Уппсала).

Кристалічну отруту щитомордників (*A. blomhoffii ussuriensis*, *A. halys halys*, *A. acutus* та *A. brevicadus*) отримували від Beijing Neutronics Imports & Exports Trading Co. Ltd. (Китай, Пекін).

Фібриноген бика одержували з плазми шляхом осадження 16 % розчином Na_2SO_4 з наступним відділенням кріофібриногену за методом Варецької [1].

Сертифіковану плазму крові донорів отримували на Центральній станції переливання крові МОЗ Монголії (м. Улаанбаатар).

Плазму, збагачену тромбоцитами, одержували шляхом центрифугування стабілізованої крові за 150 г протягом 10 хв при 20 °С. Кров відбирали з вушної вени кролів у пластикову пробірку у співвідношенні 9:1 до 3,8 % розчину лимоннокислого натрію.

Фібриногенолітичну активність (FgLE) визначали шляхом 30-хвилинної інкубації білків при 37 °С із фібриногеном бика з наступним додаванням 10 NIH тромбіну. Активність оцінювали якісно за фібриновим згустком. Тромбіноподібну (TLE) активність визначали за анцистроновим часом згортання нормальної плазми крові [3, 20]. Активність фосфоліпази A_2 (PLA2) визначали за розщепленням специфічного флюорогенного субстрату PED-6 (Invitrogen corp., США) [12]. Активність інгібітора агрегації тромбоцитів (IATh) визначали за зниженням агрегації тромбоцитів, індукованої 2,5 мкМ АДФ (“Технологія-Стандарт”, Росія), у збагаченій тромбоцитами плазмі (не довше 3 год зберігання) на агрегометрі AP2110 (“Солар”, Білорусь). Активність активатора протеїну С (APC) визначали з використанням хромогенного субстрату S_{2366} [22], активатора протромбіну (ApTh) – субстрату S_{2238} [23] за стандартними методиками. Вміст білків визначали за методом Бредфорда [5], калібрувальним білком слугував тромбін.

Клітинні лінії PC-12 (феохромцитомома щура) та C-1300 (нейробластома миші) було отримано з Європейського банку клітинних ліній (European Collection of Cell Cultures (ECACC)). Використовували ростове середовище DMEM з 2 мМ глутаміну, 100 МО/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину. Середовище для PC-12 містило 10 % сироватки коня (HS) та 5 % телячої ембріональної сироватки (FBS); для C-1300 – 10 % FBS.

Для визначення цитотоксичності клітини висаджували у 24-лункові планшети і вирощували до досягнення 80 % конфлюентності.

Потім ростове середовище видаляли, клітини промивали фосфатним буфером та в кожен лунку додавали 1 мл безсироваткового середовища, в яке вносили досліджуваний зразок в об'ємі, що не перевищував 10 % загального об'єму середовища в лунці; в контрольні лунки додавали такий самий об'єм буфера, в якому розчиняли зразок. Через 48 год культивування визначали кількість живих клітин методом включення тріазолілу блакитного [15].

Для вивчення диференціювання клітини лінії PC-12 висаджували у 24-лункові планшети, вкриті полі-D-лізином у щільності 4×10^4 кл.см². Після прикріплення клітин (приблизно через 6 год) ростове середовище замінювали середовищем для стимулювання DMEM, що містила 2 мМ глутаміну, 1 % HS, 0,5 % FBS, 100 МО·мл⁻¹ пеніциліну, 100 мкг·мл⁻¹ стрептоміцину. Білкові фракції отрути вносили у середовище стимулювання так, щоб об'єм доданої фракції не перевищував 10 % об'єму середовища в лунці. За позитивний контроль слугував фактор росту нервів миші 2,5-S NGF у концентрації 50 нг·мл⁻¹, за негативний контроль – такий самий об'єм DMEM без досліджуваного білка. Протягом 3–8 днів результати диференціювання фотодокументували.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Розробка методів ідентифікації цільових білків для вхідного контролю отрути змії роду *Agkistrodon*. Завданням вхідного контролю було визначити такі цільові білки, як тромбіноподібний фермент (TLE), активатори протромбіну (ApTh) та протеїну С (APC), фібрино(гено)літичні ферменти (FgLE), інгібітори агрегації тромбоцитів (IATh), та фосфоліпазу A_2 (PLA2) у цільній отруті *Agkistrodon blomhoffii ussuriensis*. Попередні дослідження показали, що цільові білки та пептиди мають молекулярні маси в діапазоні 5–60 кДа, тому на першому етапі оптимальним було застосувати хроматографію, що розділяє за розміром. Ми провели порівняльний аналіз з підбору ефективного сорбенту для фракціонування білково-пептидної фракції цільної отрути. Протестували такі сорбенти: Superose 6, Superose 12, Superdex 75 PG та Superdex 200 PG, що мали високу фізико-хімічну стабільність та практично не проявляли неспецифічної взаємодії з компонентами зразка. Було показано, що оптимальне розділення білково-пептидного складу отрути досягається за використання колонки HiLoad 26/60 Superdex 75 PG зі швидкістю потоку 1 мл·хв⁻¹, об'ємом зразка до 2 мл та концентрацією загального білка не більш ніж 40 мг·мл⁻¹ (рис. 1). Процес хроматографуван-

ня проводили у Tris-HCl буфері, pH 7,4, що містив 0,15 M NaCl. Використання даного буфера або буфера еквівалентної іонної сили дозволило запобігти неіонним взаємодіям зразка з матрицею сорбенту.

У результаті фракціонування цільної отрути у підібраних умовах було отримано 9 білкових фракцій, в яких вдалося ідентифікувати більшість цільових білків (рис. 2). FgLE виявлено у фракціях 1 та 4. Оскільки ці фракції містять білки різної молекулярної маси, було припущено, що в досліджуваній отруті присутні два різні за фізико-хімічними властивостями фібрино(гено)літичні ферменти. Фракція 2 містила 95 % TLE, інші 5 % розмивалися по фракціях 1 та 3. Питома активність TLE складала $1,9 \text{ NIH} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка отрути. Фракція 5 містила 99 % PLA2, її питома активність дорівнювала $1050 \text{ MO} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка отрути. Фракція 7 містила пептид, який інгібував АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів (IATh) на 21 % порівняно з контролем (рис. 3).

Таким чином, після першого етапу фракціонування цільної отрути було визначено чотири із шести цільових білків. Виходячи з літературних даних про молекулярну масу активаторів протеїну С та протромбіну в отруті цього роду змії [6, 13, 17, 19], ми припустили, що активності активаторів протеїну С та протромбіну маскувалися вкрай високими тромбіно-

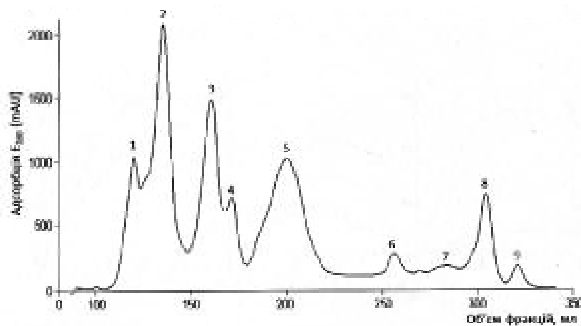


Рис. 1. Хроматографічне розділення білково-пептидної фракції з отрути *Agkistrodon blomhoffi ussuriensis* на колонці HiLoad 26/60 Superdex 75 PG (1–9 – піки білків, фракції яких збирали й аналізували).

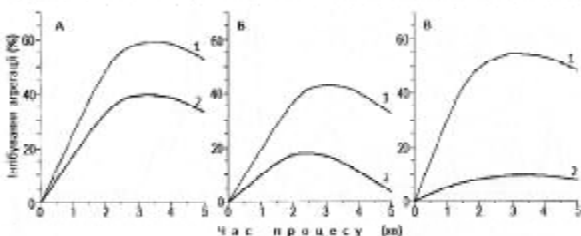


Рис. 2. АДФ-індукована агрегація тромбоцитів під впливом фракції (А) № 7 з отрути *A. blomhoffi ussuriensis* (10 мкг); (Б) № 6 з отрути *A. halys halys* (10 мкг); (В) № 7 з отрути *A. acutus* (10 мкг), отриманих з колонки HiLoad 26/60 Superdex 75 PG.

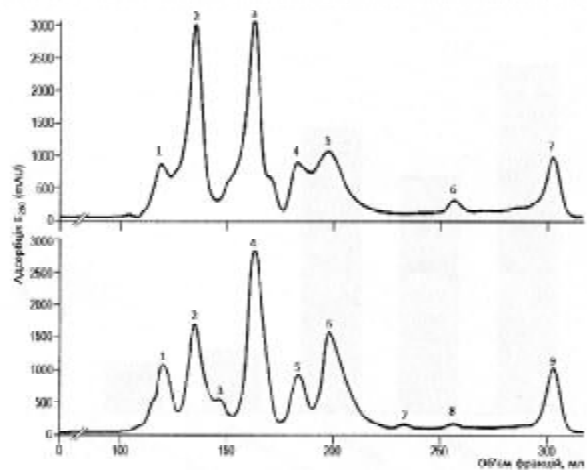


Рис. 3. Порівняльний аналіз хроматографічного розділення білково-пептидної фракції з отрути *Agkistrodon halys halys* (зверху) та *Agkistrodon acutus* (знизу) на колонці HiLoad 26/60 Superdex 75 PG (1–9 – піки білків, фракції яких збирали й аналізували).

подібною та протеїназними активностями інших білків у фракціях. Тому необхідно було застосувати другий етап хроматографії, який розділяв би білки за іншими фізико-хімічними властивостями, наприклад іонообмінну хроматографію. Даний тип хроматографії дозволяє розділити білки, які перебувають в одному діапазоні молекулярних мас, але мають різні ізоелектричні точки, а також зберегти біологічну активність. Для другого етапу вхідного контролю оптимальною виявилася аніонообмінна хроматографія на носії SOURCE Q в лінійному зростаючому NaCl-градієнті елюції. Розділення проводили з використанням 20 мМ трис-HCl буфера, pH 8,2, градієнт елюції NaCl складав від 1 до 60 мS·см⁻¹ об'ємом 20 Vc зі швидкістю 0,2 Vc·хв⁻¹, де Vc – об'єм колонки.

Для фракціонування методом аніонообмінної хроматографії було використано фракції 2, 3, 4, отримані на першому етапі вхідного контролю, оскільки білки у цих фракціях відповідають передбачуваній молекулярній масі цільових білків. У результаті проведення хроматографії було виявлено APC із питоמוю активністю $0,092 \text{ MO} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка отрути та ApTh – $0,0064 \text{ MO} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка отрути.

Таким чином, розроблений нами двохетапний підхід для контролю якості цільної отрути *Agkistrodon blomhoffi ussuriensis* дозволив виявити в ній усі цільові білки виробництва.

Застосування розробленого комплексного підходу для отрути змії *A. halys halys* та *A. Acutus*. Можливість використання розробленого підходу для контролю отрути змії інших видів роду *Agkistrodon* перевірили, застосувавши його для отрути *A. halys halys* та *A. acutus*. В результаті першого етапу фрак-

ціонування цільної отрути *A. halys halys* було отримано 7 білкових фракцій (рис. 4). Аналіз одержаних фракцій виявив присутність у фракції 2 TLE з питомою активністю 3,9 NIH·мг⁻¹ білка отрути. Крім того, фракція 2 містила до 99 % FgLE. PLA2 елюювали з колонки у фракціях 4 та 5; її питома активність складала 807 МО·мг⁻¹ білка отрути. У фракції 6 було виявлено IATh; ступінь інгібування агрегації складав 27 % відносно контролю (рис. 3).

Другий етап розділення з використанням іонообмінної хроматографії фракцій 2, 3, 4 показав, що дана отрута містить APC з питомою активністю 0,02 МО·мг⁻¹ білка отрути. На відміну від отрути *A. blomhoffi ussuriensis* ApTh у даній отруті не було виявлено.

Застосувавши той самий підхід для фракціонування цільної отрути *A. acutus*, в результаті першого етапу фракціонування отримали 9 білкових фракцій (рис. 4). Тестування зразків виявило, що фракція 2 містила 90 % TLE з питомою активністю 5,8 NIH·мг⁻¹ білка отрути, решту визначили у фракціях 1 та 3. FgLE знайшли у фракціях 2 та 5, що дозволило припустити наявність двох молекулярних форм ферменту в даній отруті. Фракція 6 містила 99 % PLA2 цільної отрути з питомою активністю 720 МО·мг⁻¹ білка отрути. Фракція 7 містила IATh; ступінь інгібування агрегації складав 45 % відносно контролю (рис. 3).

У результаті застосування аніонообмінної хроматографії до фракцій 2, 3, 4, отриманих в результаті першого етапу фракціонування отрути *A. acutus*, було виявлено ApTh з питомою активністю 0,02 МО·мг⁻¹ білка отрути. APC в отриманих фракціях не було ідентифіковано.

На основі одержаних даних було проведено порівняльний аналіз отрути трьох різних

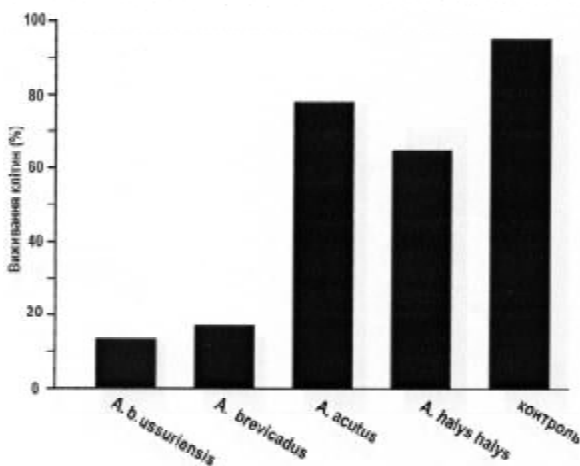


Рис. 4. Вживання клітин лінії PC-12 через 48 год культивування з отрутою змій, доданою у ростове середовище. За контроль брали клітини, що культивувалися без отрути.

видів змій роду *Agkistrodon*. Найбільша питома активність TLE характерна для отрути *A. Acutus*, а найменша спостерігалася в отруті *A. blomhoffi ussuriensis*. APC не виявлено в отруті *A. acutus*, тоді як найвища його питома активність була властива отруті *A. blomhoffi ussuriensis*. Питома активність ApTh була найбільшою в отруті *A. Acutus* і порівняно однаковою в отруті *A. blomhoffi ussuriensis* і *A. halys halys*. Найсильніше інгібування агрегації тромбоцитів спостерігалася в результаті дії IATh з отрути *A. acutus*, а інгібуючий ефект пептидів з отрути двох інших видів був практично у 2 рази слабшим. Найбільша питома активність PLA2 була в отруті *A. blomhoffi ussuriensis*, а найменша – в отруті *A. acutus*.

Визначення цитотоксичності отрути змій роду *Agkistrodon*. Порівняльна характеристика. Цитотоксичність є важливою характеристикою для вхідного контролю отрути. Ми провели порівняльну характеристику цитотоксичності отрут раніше описаних видів змій та включили отруту змії виду *A. brevicadus*. Цитотоксичність отрути визначали на клітинах лінії C-1300 (нейробластома миші) та PC-12 (феохромцитомо щура). Результати експериментів виражали у відсотку клітин, які вижили, беручи кількість клітин, що культивувалися без додавання отрути, за 100 %.

Для клітинної лінії PC-12 було показано, що після додавання отрути *A. blomhoffi ussuriensis* виживало 14 % клітин, *A. brevicadus* – 17 %, *A. halys halys* – 82 % та *A. Acutus* – 68 % (рис. 5). Спрямованість дії отрути на клітини лінії C1300 виявилася відповідною, але ці клітини мали дещо меншу чутливість: з отрутою *A. blomhoffi ussuriensis* вижило 20 % клітин, *A. brevicadus* – 21 %, *A. halys halys* – 86 % та *A. Acutus* – 79 % (рис. 6). Таким чином, найбільш цитотоксичними виявилися отрути змій *A. blomhoffi ussuriensis* та *A. brevicadus*. Ці результати корелюють з такими дослідженнями, де показано, що саме для даних отрут характерна найбільша питома активність PLA2. Цитотоксичність PLA2 з отрути *A. blomhoffi ussuriensis* було описано раніше [7, 9].

Вхідний контроль отрути *A. brevicadus*. Наступним завданням була перевірка, чи відповідатиме отрута змії виду *A. brevicadus* вимогам виробництва для отримання цільових білків – FgLE, PLA2, IATh, APC та фактора росту нервів (NGF). Оскільки вищеописаний комплексний підхід дозволяв виявляти згадані білки (окрім NGF), ми застосували його для вхідного контролю отрути *A. brevicadus*.

У результаті першого етапу фракціонування отрути було отримано 12 білкових фракцій

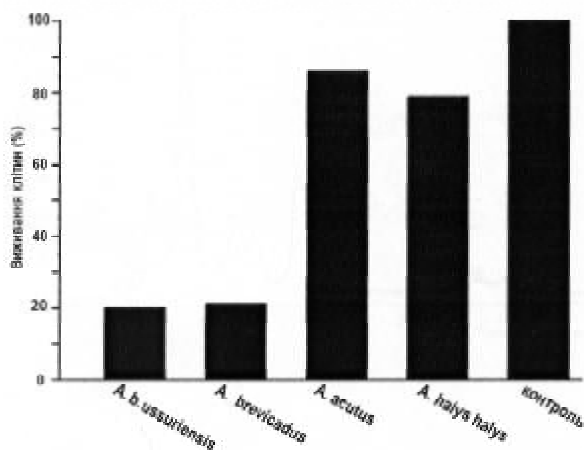


Рис. 5. Вживання клітин лінії PC-1200 через 48 год культивування з отрутою змій, доданою у ростове середовище. За контроль брали клітини, які культивувалися без отрути.

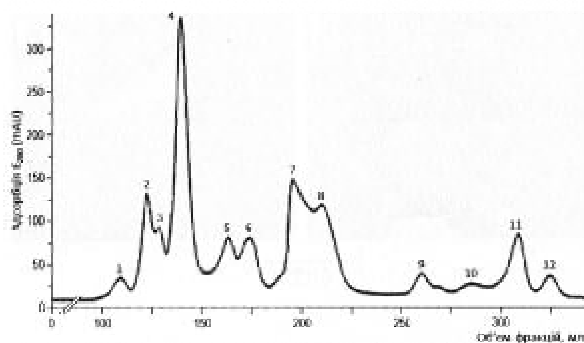


Рис. 6. Хроматографічне розділення білково-пептидної фракції з отрути *A. brevicadus* на колонці *HiLoad 26/60 Superdex 75 PG* (1–12 – піки білків, фракції яких збирали й аналізували).

(рис. 7). FgLE виявлено у фракціях 1–3 і 6, що свідчить про наявність двох різних FgLE або його ізоформ, як і у випадку з отрутою *A. ussuriensis*. PLA2 елюювали з колонки у фракціях 7 і 8 з питомою активністю в об'єднаній фракції 980 МО·мг⁻¹. IATh було виявлено у фракції 10; ступінь інгібування становив 37 % порівняно з контролем (рис. 8). На другому етапі (аніонообмінна хроматографія) в отруті *A. brevicadus* було визначено APC.

Для визначення наявності NGF у досліджуваній отруті білкові фракції, отримані в результаті першого етапу, вносили в середовище культивування клітин лінії PC-12, що є прийнятною моделлю визначення активності NGF, який стимулює їх диференціювання, що виявляється у специфічному фенотипі – великі дендрити, які легко ідентифікуються у мікроскопі [18]. Позитивним контролем слугував 2,5 S-NGF миші.

Культивування клітин лінії PC-12 за присутності білків з фракцій отрути *A. brevicadus* не виявило NGF. Жодна з внесених фракцій

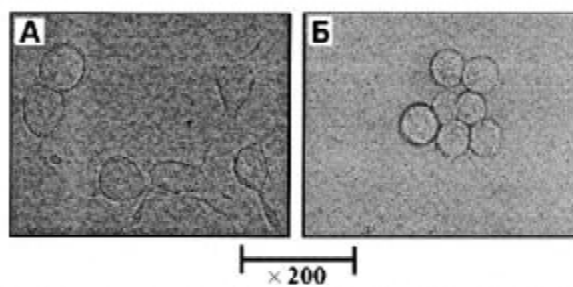


Рис. 7. Диференціювання клітин лінії PC-12 під дією: А – фактора росту нервів миші 2,5 S-NGF; Б – однієї з фракцій отрути *A. brevicadus*, отриманої з колонки *HiLoad 26/60 Superdex 75 PG* (інші фракції не проявляли ефекту росту дендритів або проявляли сильну токсичність).

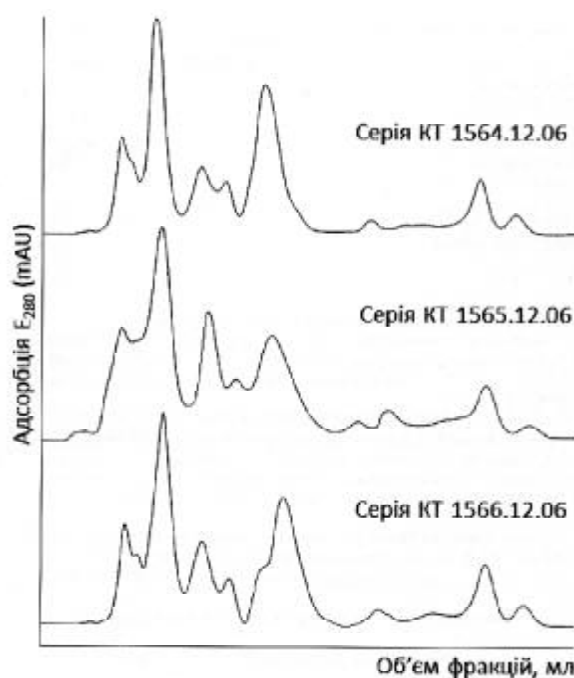


Рис. 8. Хроматографічне розділення білків з отрути *A. brevicadus* трьох різних серій на колонці *HiLoad 26/60 Superdex 75 PG*.

не викликала диференціювання клітин, на відміну від позитивного контролю. Відомо, що отрути змій роду *Agistrodon* містять NGF [11], але останнім часом було показано, що існує залежність синтезу NGF від віку змії [16] – чим вік змії більший, тим менше фактора виявляють в отруті, а зрілі змії зовсім його не мають.

Отже, вхідний контроль отрути *A. brevicadus* показав, що в ній присутні такі цільові білки: FgLE, PLA2, IATh і APC. NGF не було виявлено. Отрута мала сильний цитотоксичний ефект.

Інформація про ідентичність різних серій сировини є невід'ємним етапом вхідного контролю, а у випадку отрути змій набуває особливого значення. Зміни у складі сировини автоматично призводять до необхідності корегування технологічних процесів, тому важ-

ливо мати таку інформацію до початку фракціонування цільної отрути. Ми застосували розроблений комплексний підхід для порівняння білково-пептидного складу трьох різних серій отрути *A. brevicaudus*. Отруту фракціонували, як описано вище для першого етапу вхідного контролю, а отримані хроматограми порівнювали щодо часу утримання піків на колонці та їх інтенсивності.

Аналіз білково-пептидного складу трьох серій отрути *A. brevicaudus* показав незначні відмінності між ними, а також з попередньо використаною серією отрути. Такі відмінності не потребували внесення коректив у технологію отримання цільових білків, однак вказували на зміни у кількісному виході цільових білків у процесі очищення.

ВИСНОВКИ. На прикладі сировини від трьох видів змій роду *Agistrodon* було доведено, що розроблений підхід для вхідного конт-

ролю є комплексом простих і швидких методів ідентифікації цільових продуктів в отруті змій, а також ідентифікації та порівняння різних серій отрути змій одного виду. Процедура двоетапного хроматографічного фракціонування дала можливість розділити ферменти протилежної біологічної дії, що дозволило ідентифікувати цільові білки та оцінити їх кількість у цільній отруті. Представлений комплекс методів надав можливість провести якісне та кількісне визначення тромбіноподібного і фібрино(гено)літичних ферментів, фосфоліпази A₂, активаторів протеїну C та протромбіну, інгібітора активації тромбоцитів. Крім того, відсутність фактора росту нервів у складі отрути, визначена за допомогою розроблених підходів, довела, що всі серії отрути отримані від зрілих змій. Показано, що цитотоксичність отрути змій роду *Agistrodon* відрізняється залежно від виду змій та є важливою характеристикою для вхідного контролю.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Варецкая Т. В. Микрогетерогенность фибриногена. Кривофибриноген / Т. В. Варецкая // Укр. біохім. журн. – 1960. – **32**. – С. 13–24.
2. Культура клеток как инструмент в разработке препаратов из компонентов яда змей. Цитотоксичность / А. И. Жукова, О. Ганболд, В. Н. Карбовская [и др.] // Биофарм. журн. – 2010. – **2**, № 2. – С. 3–8.
3. Меньшиков В. В. Лабораторные методы исследования в клинике / В. В. Меньшиков. – М., 1987. – С. 310.
4. Anurag S. Quality by design for biopharmaceuticals / S. Anurag, Rathore & Helen Winkle // Nature Biotech. – 2009. – **27**. – P. 26–34.
5. Bradford M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – **78**. – P. 248–254.
6. Carolyn L. Orthner. Characterization of a Protein C activator from the venom of *Agkistrodon contortrix* / Carolyn L. Orthner, Prabir Brattacharia, K. Dudley Strickland // Biochemistry. – 1988. – **27**, № 7. – P. 2558–2564.
7. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A₂ on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro / B. Lomonte, Y. Angulo, S. Rufini [et al.] // Toxicon. – 1999. – **37**, № 1. – P. 145–158.
8. Daltry J. C. Diet and snake venom evolution / J. C. Daltry, W. Wuster, R. S. Thorpe // Nature. – 1996 – **379**. – P. 537–540.
9. Effect of a recombinant Lys49PLA₂ myotoxin and Lys49PLA₂-derived synthetic peptides from *Agkistrodon* species on membrane permeability to water / Leite R.S., Giuliani C.D., Lomonte B. [et al.] // Toxicon. – 2004. – **44**, № 2. – P.157–159.
10. Francis S. Markland. Snake venoms and the hemostatic system / S. Francis Markland // Toxicon. – 1997 – **36**. – P. 1749–1800.
11. Liying Guo. Nerve growth factor activity of several immunal related serine proteases / Liying Guo, Hong Zhu, Yuancong Zhou // Chinese J. Biochem. Mol. Biol. – 1999. – **43**, № 22. – P. 1886–1891.
12. Li Z. Phosphatidylcholine homeostasis and liver failure / Z. Li, L. B. Agelon, D. E. Vance // J. Biol. Chem. – 2005. – **280**, № 45. – P. 37798–37802.
13. Manjunatha Kini. The intriguing world of prothrombin activators from snake venom / Manjunatha Kini // Toxicon – 2005. – **45**, № 8. – P.1133–1145.
14. Matsui T. Snake venom proteases affecting haemostasis and thrombosis / T. Matsui, Y. Fujimura, K. Titani // Biochem. Biophys. Acta. – 2000. – **14** (77). – P. 146–156.
15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mosmann // J. Immunol. Methods. – 1983. – **65**, No. 1-2. – P. 55–63.
16. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox* / R. A. Guercio, A. Shevchenko, A. Shevchenko [et al.] // Proteome Sci. – 2006. – **4**. – P. 11–25.
17. Protein C activators in snake venoms / K. Stocker, H. Fisher, J. Meir [et al.] // Behring Inst. Mitt. – 1986. – **79**. – P. 37–47.
18. Robinson C. J. An in vitro Bioassay for nerve growth factor based on 24-hour survival of PC-12 cells / C. J. Robinson, R. Stammers // Growth Factors. – 1994. – **10**. – P. 193.

19. Rosinga Jan. Structural and functional properties of Snake venom prothrombin activators / Jan Rosinga, Guido Tansa // *Toxicon* – 1992. – **30**, № 12. – P. 1515–1527.

20. Seligson D. CRC Handbook Series in Clinical Laboratory Science. Section I / D. Seligson // *Hematology*. – 1980. – **3**. – P. 301.

21. The diversity of bioactive proteins in Australian snake venoms / G. W. Birrell, S. T. H. Earl, T. P. Wallis [et al.] // *Molecular and Cellular Proteomics*. Ed. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. – 2007. – P. 973–986.

22. http://www.diapharma.com/products/hemostasis/chromogenic_substrates/activated_protein_c_apc/s821090_821090

23. http://www.diapharma.com/products/hemostasis/chromogenic_substrates/thrombin/s820324_820324

24. http://www.gmpua.com/Biotechnology/USA/InternationalBiotechnologyGMP/International_BiotechnologyGMP.PDF Anisfeld M.H. // *International Bio technology, Bulk Chemical, and Pharmaceutical GMPs*. Fifth edition. USA, Englewood: Interpharm Press.— P. 757.

25. http://www.farosplus.ru/index.htm?/bad/bad_36/bad_36.htm

А. И. Жукова^{1,2}, Е. Н. Краснобрыжая², С. П. Гаврилюк², Г. Л. Волков^{1,2}
ТОВ “НЕЙТРОМИКС УКРАЇНА”¹, КИЇВ
SHIJIR INTERNATIONAL CO. LTD.², ДОЛИНА ДОЖДІЙ, МОНГОЛІЯ

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЦЕЛЕВЫХ БЕЛКОВ ЯДА ЗМЕЙ РОДА *AGKISTRODON*

Резюме

На основе яда *Agkistrodon blomhoffi ussuriensis* разработан комплекс методов входящего контроля ядов змей рода *Agkistrodon*, который включает два этапа хроматографического разделения цельного яда и методы определения биологической активности целевых белков. С использованием методов было определено содержание следующих целевых белков: тромбиноподобного фермента, активаторов протромбина и протеина С, фибрино(гено)литического фермента, ингибитора агрегации тромбоцитов и фосфолипазы A_2 . Универсальность разработанного входящего контроля яда змей рода *Agkistrodon* была доказана путём удовлетворительного его применения для ядов видов *A. halys halys*, *A. Acutus* и *A. brevicadus*. Приведена сравнительная характеристика нескольких серий яда *A. brevicadus*; изучена цитотоксичность для всех исследуемых ядов; проведена сравнительная характеристика.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: яд змей рода *Agkistrodon*, контроль качества, жидкостная хроматография, цитотоксичность.

A. I. Zhukova^{1,2}, Ye. M. Krasnobryzha², S. P. Havrylyuk², H. L. Volkov^{1,2}
JSC “NEUTROMICS UKRAINE”¹, KYIV
SHIJIR INTERNATIONAL CO. LTD.², BORO VALLEY, MONGOLIA

THE METHODS DEVELOPMENT FOR TARGET PROTEINS IDENTIFICATION IN THE *AGKISTRODON* SNAKE VENOM

Summary

On the basis of *Agkistrodon blomhoffi ussuriensis* venom we developed a complex of methods for the incoming control included two stages of chromatographic crude venom fractionating and biological activity determination reactions of the target proteins. Using this approach we managed a determination following target proteins: thrombin-like enzyme, prothrombin and protein C activators, fibrino(genolytic) enzymes, platelet aggregation inhibitor and phospholipase A_2 . Universality of the developed approach was approved by its application for the incoming control *A. halys halys*, *A. Acutus* and *A. brevicadus* venoms. Comparative characteristics of the several different batches of *A. brevicadus* venom was held. A cytotoxicity for all investigated venoms was studied.

KEY WORDS: *Agkistrodon* snake venom, quality control, chromatography, cytotoxicity.

Отримано 12.09.11

Адреса для листування: А. І. Жукова, просп. Героїв Сталінграда, 16-Д, кв. 183, Київ, 04210, Україна.