

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та
медицини»

Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол № _____ засідання

кафедри

від “ _____ ” _____ 2026р.

**АНАЛІЗ ПРОТЕЇНАЗИ З ОТРУТИ ЗМІЇ
VIPERA BERUS BERUS ЯК ТРОМБОЛІТИЧНОГО АГЕНТУ**

Кваліфікаційна робота бакалавра
денної форми навчання

за спеціальністю

Біотехнології та біоінженерія

Цибка Владіслава Віталійовича

Науковий керівник від кафедри

канд. біол. наук, ст. дослідник

Галенова Т.І.

Робота виконана на базі відділу структури та функції білка Інституту біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України під керівництвом наук. співроб., доктора
філософії Стогнія Євгенія Миколайовича

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АПС	– амонію персульфат;
ДСН	– додецилсульфат натрію;
ЕДТА	– етилендіамінтетраоцтова кислота;
ЗТП	– збагачена тромбоцитами плазма;
МЗО	– металопротеїнази зміїних отрут;
МКА	– моноклональні антитіла;
ПААГ	– поліакриламідний гель;
СПЗО	– серинові протеїнази зміїних отрут;
ССЗ	– серцево-судинні захворювання;
ТЕМЕД	– тетраметилетилендіамін;
β -МЕ	– β -меркаптоетанол;
GP	– glycoprotein (глікопротеїн);
HEPES	– 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (4-(2-гідроксіетил)-1-піперазинетансульфонова кислота);
TF	– tissue factor (тканинний фактор);
tPA	– tissue plasminogen activator (тканинний активатор плазміногену);
Tris	– tris(hydroxymethyl)aminomethane (трис-(гідроксиметил)-амінометан);
uPA	– urokinase plasminogen activator (урокиназний активатор плазміногену);
vWF	– von Willebrand factor (фактор фон Віллебранда).

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. ЗМІЇНІ ПРОТЕЇНАЗИ У ЛІКУВАННІ СЕРЦЕВО-СУДИННИХ ЗАХВОРЮВАНЬ	6
1.1. Загальна характеристика системи гемостазу	6
1.2. Тромбоз: патогенез, класифікація та сучасні підходи до лікування	12
1.3. Зміїні отрути як джерело протеїнів, що впливають на гемостаз	15
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	24
2.1. Матеріали та реактиви	24
2.2. Отримання плазми крові людини	25
2.3. Виділення та очистка фібриногену	26
2.4. Визначення концентрації білків	26
2.5. Аналіз отриманих білкових зразків методом електрофорезу у поліакриламідному гелі	27
2.6. Умови проведення обмеженого протеолізу фібриногену	28
2.7. Турбідиметричний аналіз полімеризації фібрину	28
2.8. Оцінка агрегації тромбоцитів	29
2.9. Імунодетекція продуктів протеолізу фібриногену та фібрину методом вестерн-блот	29
2.10. Оцінка протеолітичної активності методом ензим-електрофорезу.....	30
2.11. Очищення протеїнази з отрути <i>Vipera berus berus</i>	30
2.12. Статистична обробка результатів дослідження	31
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ	32
3.1. Виділення та характеристика протеїнази	32
3.2. Аналіз субстратної специфічності протеїнази	36
3.3. Оцінка полімеризації фібрину за дії протеїнази	39
3.4. Оцінка агрегації тромбоцитів за дії протеїнази	41
ВИСНОВКИ	44
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	45

ВСТУП

Серцево-судинні захворювання (ССЗ) – провідна причина смертності у світі. За даними ВООЗ, щороку від них помирає близько 31% населення планети [1, 2], а в країнах ЄС цей показник складає 37% [3]. Переважна частина цих смертей припадає на гострі тромботичні ускладнення: інфаркт міокарда, ішемічний інсульт, тромбоз глибоких вен, тромбоемболію легеневої артерії [4].

Найбільш розповсюдженими фармакологічними підходами до лікування цих станів є застосування активаторів плазміногену – тканинного активатора плазміногену (tPA), стрептокінази, урокінази – та антикоагулянтів [4]. Проте обидві групи препаратів мають свої недоліки. Їх використання може призводити до геморагічних ускладнень, які трапляються часто і нівелюють частину клінічного ефекту [5, 6]. Вони також мають слабку дію на ретраговані тромби, у яких недостатня кількість плазміногену для того, щоб активатори могли спрацювати [5]. Через це пошук агентів прямої дії, які руйнують фібрин та не потребують допомоги плазмінової системи, є одним із пріоритетних напрямів. Зміїні отрути медично важливої родини *Viperidae* активно досліджуються, оскільки вони є основою переважної частини ліків із тваринних токсинів [5, 7-9].

У 1968 році вчені припустили, що антикоагулянтного ефекту можна досягти, повністю видаливши фібриноген із плазми ензимами зміїної отрути. Подальші дослідження цієї теорії це підтвердили: такі ферменти швидко руйнують уже сформовані фібринові згустки й дають стійкий антитромботичний ефект. Використання високоочищених препаратів такого типу може бути перспективним рішенням для лікування серцево-судинних захворювань, оскільки вони не мають побічної фармакологічної активності [10].

Токсини змії родини *Viperidae* є перспективним варіантом, оскільки їх отрути багаті на серинові протеїнази та металопротеїнази, дія яких вибірково

спрямована на окремі ланки гемостазу [5, 11]. Частина цих білків уже застосовується в медичній практиці або пройшла клінічні випробування: батроксобін [3, 12], альфімепраза [3, 5, 11], анкрод [3, 13]. Інші поки що лише досліджуються: муталізін-II з отрути *Lachesis muta muta* [14], кістомін з *Calloselasma rhodostoma* [5, 15], барнеттлізін-I з *Bothrops barnetti* [7]. Три останні ферменти цікаві тим, що поєднують дві властивості відразу: розщеплюють фібриноген і гальмують агрегацію тромбоцитів [7, 14].

В Україні є два види отруйних змій: гадюка звичайна (*Vipera berus berus*) та гадюка Нікольського (*Vipera berus nikolskii*). На металопротеїнази в отруті *Vipera berus berus* припадає близько 19% білків, на серинові протеїнази припадає близько 31% [16, 17]. Гемотоксична дія цієї отрути проявляється у фібринолізі, активації фібринолізу, геморагічному ефекті [16, 18]. Раніше з цієї отрути вже були виділені та схарактеризовані геморагічні металопротеїнази, а також ферменти з фактор X-активуючою та фібринолітичною активністю [19-21]. Попри це, негеморагічні протеази з неї, які потенційно могли б стати основою прямих тромболітиків, досі не виділені й не описані як слід.

На основі зазначених фактів та актуальності цього наукового питання було поставлено відповідну мету роботи: охарактеризувати протеїназу з отрути *Vipera berus berus* та оцінити її потенціал як тромболітичного агента.

Для досягнення мети було поставлено такі завдання:

1. Підтвердити наявність в отруті *Vipera berus berus* протеїнази із фібрин(оген)олітичною активністю
2. Дослідити специфічність дії протеїнази щодо поліпептидних ланцюгів молекули фібриногену.
3. Оцінити тромбін-індуковану полімеризацію фібрину за дії протеїнази з отрути *Vipera berus berus*.
4. Оцінити аденозиндифосфат-індуковану агрегацію тромбоцитів за умов часткового гідролізу фібриногену на тлі присутності протеїнази з отрути *Vipera berus berus*.

РОЗДІЛ 1

ЗМІНИ ПРОТЕЇНАЗИ У ЛІКУВАННІ СЕРЦЕВО-СУДИННИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

1.1. Загальна характеристика системи гемостазу

Гемостаз – це складна, організована серія подій, спрямована на підтримання циркулюючої крові у рідкому стані та запобігання крововтраті після пошкодження шляхом утворення кров'яного згустку. Організм підтримує складний баланс для збереження гемостазу – процес, який включає взаємодію циркулюючих клітин крові, різноманітних факторів згортання, тромбоцитів і фібринолітичних факторів, а також взаємодію із судинною стінкою та медіаторами ендотеліальних клітин [22]. Гемостатична система ссавців еволюціонувала для швидкого реагування на пошкодження судин та мінімізації крововтрати шляхом формування гемостатичної пробки, що складається з тромбоцитів і зшитого фібрину. Тромбоцити є основним клітинним компонентом гемостатичної системи, тісно взаємодіючи з компонентами коагуляційного каскаду, а саме з білками згортання та фібриногеном/фібрином [6]. Гемостаз є складним процесом, у якому беруть участь судини, тромбоцити та плазмові фактори згортання, а порушення рівноваги між утворенням фібрину та фібринолізом призводить до внутрішньосудинного тромбоутворення, що обмежує кровотік і спричиняє ССЗ [1].

За нормальних фізіологічних умов ендотеліальні клітини створюють поверхню, що захищає від активації тромбоцитів та запуску коагуляційного каскаду [4]. Судинний ендотелій інгібує активацію тромбоцитів через кілька механізмів, включаючи вивільнення простагландину I₂ та оксиду азоту, а також експресію ектонуклеотидаз, які деградують активатори тромбоцитів аденозинтрифосфат (АТФ) та аденозиндифосфат (АДФ) [6]. Прокоагулянтно-

антикоагулянтний баланс підтримується взаємодією між тромбоцитами та судинним ендотелієм з переважанням активних антикоагулянтних сил [23].

Тромбоцити – це малі без'ядерні клітини, що продукуються мегакаріоцитами в кістковому мозку та вивільняються в кров, де вони циркулюють протягом 7–10 днів [6]. Тромбоцити крові відіграють вирішальну роль у гемостазі та в розвитку артеріального тромбозу і ССЗ [7]. Тромбоцити є ключовими ефекторами утворення тромбу, але також відіграють вирішальну роль під час запалення, що ставить їх у центральну позицію у взаємодії між тромбозом та запаленням [24].

У відповідь на пошкодження судин тромбоцити швидко прикріплюються до експонованих субендотеліальних матриксних білків, переважно фактора фон Віллебранда (vWF) та колагену [5]. Після пошкодження ендотеліальних клітин в умовах високого напруження зсуву vWF з плазми зв'язується з оголеним колагеном, а тромбоцити прилипають до колаген-зв'язаного vWF через глікопротеїн (GP) I β у складі їхнього комплексу GPI β /V/IX [4, 6]. При високих зсувних силах адгезія тромбоцитів залежить від зв'язування комплексу GPI β -IX-V з його лігандом, vWF, і підтримується колагеновими рецепторами – інтегрином $\alpha_2\beta_1$ та імуноглобуліноподібним рецептором GPVI [7]. Два тромбоцитарних рецептори – $\alpha_2\beta_1$ та GPVI – є важливими для активації тромбоцитів та їх накопичення на колагені [6].

GPI β та GPVI відіграють значну роль в активації та агрегації тромбоцитів і є потенційними мішенями для антитромботичного лікування [14]. GPVI є переважним тромбоцитарним рецептором для колагену I типу. Дефіцит GPVI проявляється незначною схильністю до кровотечі, тому GPVI викликав значний інтерес як мішень для антитромботичної терапії, оскільки його інгібування корелює зі зниженим ризиком кровотечі [14].

Стимуляція GPVI індукує активацію тромбоцитів, що призводить до секреції та сигналізації інтегринів $\alpha_2\beta_1$ та $\alpha_{IIb}\beta_3$. Активованій інтегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$ зв'язується з фібриногеном, vWF або іншими адгезивними субстратами, що

призводить до міцної адгезії та стабільної агрегації активованих тромбоцитів [4].

Після адгезії та агрегації тромбоцити вивільняють протромботичні фактори, зокрема тромбоксан А₂, АДФ та вміст їхніх α -гранул, що рекрутують більше тромбоцитів із кровоплину, утворюючи оклюзивні агрегати (первинний гемостаз) [4, 6, 14]. Тромбін також є потужним активатором тромбоцитів і забезпечує перехресну взаємодію між тромбоцитарним та коагуляційним шляхами [6].

Фактори зсідання крові являють собою ключовий клас протеаз та кофакторів, що діють спільно. Протеази системи коагуляції синтезуються в печінці у вигляді неактивних попередників (зимогенів) і секретуються у кров. При пошкодженні судини зимогени перетворюються в активну форму шляхом селективного ферментативного розщеплення пептидних зв'язків [23].

Згортання крові може бути ініційоване як внутрішнім шляхом (контактна активація), так і зовнішнім шляхом (тканинний фактор). Ці два шляхи зливаються у спільний кінцевий шлях утворення тромбіну та формування фібринового згустку [22, 23].

Зовнішній шлях включає взаємодію між трансмембранним рецептором – тканинним фактором (TF) та плазмовим фактором VII/VIIa. Комплекс TF–FVIIa є фізіологічним тригером згортання крові [6]. Утворений комплекс TF:FVIIa активує фактор IX до FIXa та фактор X до FXa на поверхні тромбоцитів за участі кальцію [23].

Внутрішній шлях включає взаємодію між плазмовими факторами XI, IX та VIII. Активованій FXIa активує FIX, який, у свою чергу, активує фактор X за участі активованого фактора VIII та кальцію на поверхні тромбоцитів. Ефектори обох шляхів активують фактор X – точку конвергенції, що інтегрує їхні функції [23].

Активованій фактор Xa перетворює протромбін на тромбін за участі кофактора Va та іонів кальцію [23]. Тромбін є центральною протеазою в коагуляційному каскаді [6]. Активний тромбін перетворює фібриноген на

фібрин, активує кофактори FV та FVIII, активує фактор XIII до фактора XIIIa (своєю чергою бере участь у перехресному зшиванні фібрину), активує інгібітор фібринолізу, що активується тромбіном, а при зв'язуванні з тромбомодуліном генерує активований протеїн C, який інгібує фактор Va та фактор VIIIa [6, 13, 23].

Фібриноген людини, що циркулює в концентраціях 2–4 г/л, є глікопротеїном масою 340 кДа, який складається з 3 пар поліпептидних ланцюгів: A α , B β та γ , з'єднаних 29 дисульфідними зв'язками [4, 25]. Структурно фібриноген має видовжену тринодулярну структуру довжиною 45 нм і складається з центрального E-регіону та 2 зовнішніх D-регіонів (конфігурація D-E-D) [25, 26]. При протеолітичній активації α -тромбіном він полімеризується у високоорганізовану фібринову мережу, яка утворює нерозчинний кров'яний згусток [27].

Тромбін відщеплює фібринопептиди A від A α ланцюгів фібриногену, утворюючи фібринові мономери з відкритими сайтами зв'язування. Молекули фібрину полімеризуються у двониткові протофібрили через нековалентні взаємодії між D та E регіонами [25, 26]. Після утворення протофібрил їх латеральна агрегація, опосередкована взаємодіями між α C-регіонами молекул, призводить до утворення фібринової мережі [26].

Зшивання фібринових волокон каталізується активованим фактором XIIIa, який утворює ковалентні зв'язки між α -ланцюгами та γ -ланцюгами фібрину, що стабілізує фібринову сітку [4, 25]. Під час цього процесу формується щільна сітка, яка захоплює фактори коагуляції та еритроцити, утворюючи компактний кров'яний згусток (вторинний гемостаз) [4]. Мережа фібринових волокон є основним структурним компонентом тромбів [26]. Структурні властивості фібринової мережі, такі як розмір пор, довжина та діаметр волокна, контролюються багатьма факторами, включаючи концентрації ферментів, швидкість кровотоку та клітинний склад [26]. Підвищений рівень фібриногену збільшує концентрацію фібринової мережі, її

жорсткість та стійкість до фібринолітичного процесу, що підвищує ризик венозного тромбозу та венозної тромбоемболії [1].

Турбідиметрія є широко використовуваним методом дослідження полімеризації фібрину та структури фібринової мережі завдяки його доступності та простоті реалізації [28]. Зростання мутності зразка під час полімеризації фібрину пов'язане з латеральною агрегацією протофібрил у товстіші волокна, що збільшує розсіювання світла [26]. Основні параметри, що визначаються з турбідиметричних кривих, включають лаг-фазу, максимальну мутність, час досягнення максимальної мутності та максимальну швидкість утворення згустку (V_{max}), які відображають кінетику полімеризації та морфологію фібринової мережі [28].

Активация механізму коагуляції жорстко регулюється ендогенними антикоагулянтами [23]. Антитромбін є основним ендогенним антикоагулянтом людини, який інгібує кілька ключових ферментів каскаду згортання (тромбін, фактор IXa та фактор Xa) [6, 16, 29]. Інгібітор шляху тканинного фактора інгібує фактор Xa, фактор Va та ініціюючий комплекс TF–FVIIa [6, 29]. Активованій протеїн C разом зі своїм кофактором протеїном S також відіграє важливу роль у регуляції генерації тромбіну *in vivo*, розщеплюючи та інактивуючи кофактори фактора Va та фактора VIIa [6, 29]. α_2 -макрोगлобулін є неспецифічним інгібітором протеїназ у крові, який інгібує всі класи протеїназ за допомогою механізму «пастки» [30]. Запуск цього механізму відбувається, коли протеаза розщеплює специфічний «регіон-приманку». Це спричиняє глобальну структурну трансформацію α_2 -макрोगлобуліна, внаслідок якої фермент виявляється незворотно захопленим (ізолюваним) всередині молекули інгібітора [31].

Фібриноліз – це безперервний фізіологічний процес розщеплення фібринового згустку, який забезпечує баланс між утворенням і розпадом фібрину [32]. Фібринолітична система видаляє гемостатичні пробки з судинного русла після загоєння рани [6]. Ключовим компонентом фібринолітичної системи є плазміноген – неактивний профермент, який

перетворюється на активний фермент плазмін за дією tPA, урокіназного активатора плазміногену (uPA), калікреїну або фактора XIIIa [16, 23]. Плазміноген є глікопротеїном масою 92 кДа, що складається з 791 амінокислотного залишку, 24 дисульфідних містків та 5 гомологічних крінглових доменів, які містять лізин-зв'язувальні сайти для взаємодії з фібрином [1]. Активація плазміногену відбувається шляхом розщеплення пептидного зв'язку між Arg561 та Val562 за участю tPA або uPA, у результаті чого утворюється плазмін, що містить каталітичну тріаду серинової пептидази – His603, Asp646, Ser741 [1]. Плазмін деградує фібрин на розчинні продукти деградації фібрину [6, 16]. Перехресно зшитий фібрин забезпечує поверхню зв'язування для плазміногену [32].

Плазмін активує як tPA, так і uPA шляхом розщеплення їхніх одноланцюгових форм на більш активні дволанцюгові форми, створюючи петлю позитивного зворотного зв'язку, яка забезпечує стійке перетворення неактивного плазміногену на активний плазмін [2, 23]. Структура фібринового згустку впливає на фібриноліз: щільніші згустки з меншими порами менш чутливі до лізису [32].

Фібриноліз контролюється переважно інгібіторами, які регулюють утворення та активність плазміну [33]. Основні інгібітори включають α_2 -антиплазмін, інгібітор активатора плазміногену-1 та тромбін-активований інгібітор фібринолізу [6, 23, 32, 33]. Інгібітор активатора плазміногену-1 інгібує активатори плазміногену: tPA та uPA. Активність плазміну інгібується його прямим інгібітором, α_2 -антиплазміном [33]. Під час утворення згустку α_2 -антиплазмін ковалентно зшивається з фібрином завдяки активності фактора XIIIa [33]. Тромбін-активований інгібітор фібринолізу відщеплює С-кінцеві лізини від частково деградованого фібрину, зменшуючи сайти зв'язування плазміногену та стабілізуючи тромб [23, 33]. До низькомолекулярних інгібіторів фібринолізу також належать аналоги лізину, такі як транексамова кислота та епсилон-амінокапронова кислота [2].

Гіперфібриноліз може призводити до підвищення схильності до кровотеч, тоді як гіпофібриноліз асоціюється з підвищеним ризиком тромбозу [32]. Кінцевою метою досліджень антикоагулянтів є ідентифікація агентів, які можуть ефективно запобігати тромбозу, не порушуючи фізіологічний гемостаз, тим самим мінімізуючи або усуваючи ризик кровотечі [34].

1.2. Тромбоз: патогенез, класифікація та сучасні підходи до лікування

Тромбоз – це утворення кров'яного згустку всередині кровоносної судини, що потенційно може блокувати кровотік і призводити до серйозних судинних захворювань, таких як інфаркт міокарда, інсульт, тромбоз глибоких вен, легенева емболія та захворювання периферичних артерій [4]. Надмірна активація тромбоцитів та системи коагуляції призводить до утворення тромбів у кровоносних судинах, що частково або повністю блокують кровотік [6, 22]. Тромбоз є провідною причиною смерті у світі та відповідає за кожну четверту смерть [6, 14]. За даними ВООЗ, ССЗ є причиною близько 31% усіх смертей у світі (приблизно 17,9 мільйона смертей щорічно) [1, 2]. Частота тромбозів зростає з віком, а його ускладнення є однією з провідних причин довготривалої захворюваності та зниження якості життя [6, 35]. ССЗ вважаються основною причиною смерті у світі, при цьому ішемічна хвороба серця сягає 9 мільйонів смертей на рік [3, 36]. Венозна тромбоемболія, яка включає тромбоз глибоких вен та тромбоемболію легеневої артерії, є третім за поширеністю судинним захворюванням після інфаркту міокарда та інсульту із щорічною захворюваністю приблизно 1–2 випадки на тисячу осіб [29, 33, 34, 37, 38]. Венозна тромбоемболія може призводити до подальших клінічних станів із значною захворюваністю та смертністю, включаючи поширення тромбів, рецидиви, хронічну тромбоемболічну легеневу гіпертензію та посттромботичний синдром [38].

Аномально підвищений рівень фібриногену пов'язаний з різноманітними тромботичними станами, включаючи ішемічний інсульт, аневризму черевної аорти, захворювання периферичних судин, тромбоемболію легеневої артерії та інші ССЗ [2].

У 1856 році німецький лікар Рудольф Вірхов вперше запропонував триадну модель патогенезу, згідно з якою розвиток клінічного тромбозу можна пояснити комбінацією пошкодження стінки судини, зміненого кровотоку та/або аномального складу крові [29].

Тромбоз можна класифікувати на артеріальний та венозний залежно від локалізації [6]. Артеріальний тромбоз є переважно тромбоцитарним феноменом і зазвичай спричиняється розривом атеросклеротичних бляшок; під впливом високих сил зсуву тромби, що утворюються в артеріях, містять більшу частку тромбоцитів і більш компактний фібрин [4, 6, 23, 36]. Патолофізіологія артеріального тромбозу відрізняється від венозного внаслідок вищих зсувних сил, які вимагають vWF та його залежну від зсувних сил конформаційну зміну для адгезії тромбоцитів [5]. На відміну від артеріальних тромбів, венозні тромби формуються повільно на інтактному, але ймовірно активованому ендотелії і характеризуються багатим вмістом еритроцитів і фібрину [6, 23, 29, 33]. Тому артеріальний тромбоз лікують препаратами, що націлені на тромбоцити, тоді як венозний тромбоз лікують препаратами, що націлені на компоненти коагуляційного каскаду [1, 5, 6]. Гіпофібриноліз є сильним фактором ризику венозного тромбозу і пов'язаний з утворенням щільніших згустків з тоншими фібриновими волокнами і меншими порами [25, 33].

Один із підходів до лікування тромбозу полягає в інфузії тромболітичних агентів для розчинення тромбів та відновлення тканинної перфузії [5]. Тромболітичні агенти, такі як tPA, стрептокіназа та урокіназа, каталізують перетворення плазміногену в плазмін, що призводить до розчинення фібринової матриці тромбу [4]. Основною перевагою тромболітичної терапії є її здатність запобігати ішемічному пошкодженню шляхом покращення

кровотоку [23]. Важливо, що довгі ретраговані тромби при периферичній артеріальній оклюзії та тромбозі глибоких вен часто не містять плазміногену, тому плазмін має бути більш ефективним для лікування такого типу тромбів [5].

Тромболітична терапія має багато проблем, включаючи надмірні кровотечі, швидкий кліренс з крові та токсичність [4]. Геморагія є поширеним ускладненням усіх активаторів плазміногену [5, 33]. Усі наявні антитромботичні засоби пов'язані з підвищеним ризиком кровотечі, оскільки тромбоцити та зшитий фібрин є необхідними компонентами гемостатичних пробок, що герметизують дефекти судинної стінки [6]. Різні антикоагулянти, такі як гепарин, фондапаринукс, варфарин та ривароксабан, широко застосовуються для лікування тромбозу, проте їх використання обмежене побічними ефектами, зокрема кровотечами, геморагіями та потребою у тривалому прийомі [2]. З часом гострі тромби змінюють свій склад на колагенову матрицю у процесі ремоделювання тромбу, що обмежує ефективність фібринолізу при пізньому застосуванні [33].

Сучасні антитромботичні препарати запобігають агрегації тромбоцитів за допомогою антагоністів інтегрину $\alpha\text{IIb}\beta_3$ інгібіторів циклооксигенази (наприклад, аспірин) та інгібіторів P2Y₁₂ (наприклад, клопідогрель), але передбачають значний ризик кровотечі як побічний ефект [14]. Антикоагулянти залишаються основою лікування та профілактики венозної тромбоемболії, проте поточні обмеження наявних фармакотерапій включають неповне розсмоктування тромбу, рецидив венозної тромбоемболії та кровотечу [34]. Існує клінічна потреба у більш ефективних антитромботичних засобах [39]. Терапевтична інактивація інгібіторів фібринолізу є перспективною стратегією для лікування та профілактики венозної тромбоемболії [33]. Тромбоз є багатограним процесом, що включає гемостатичні, запальні та імунні механізми, а потенціал таргетних терапій виходить за межі традиційної антикоагуляції [35].

1.3. Зміїні отрути як джерело протеїнів, що впливають на гемостаз

Зміїні отрути, особливо родини *Viperidae*, містять надзвичайно складні суміші фармакологічно активних білків/пептидів, що порушують нормальні фізіологічні процеси відповідно до їхньої функції знерухомлення, вбивства та перетравлення здобичі [5]. Зміїні отрути є також багатим джерелом біоактивних сполук, які використовуються людиною для діагностики та терапії різноманітних захворювань. Токсини отрут еволюціонували з близькоспоріднених білків організму, які функціонально диверсифікувалися шляхом дуплікації генів та адаптивної еволюції [40].

Отрута змії є сумішшю переважно ферментів та неферментативних білків або пептидів, що становлять від 90% до 95% сухої маси отрути [3, 36]. Основні білкові родини зміїних отрут включають: металопропротеїнази, серинові протеїнази, фосфоліпази A2, L-амінокислотні оксидази, а також неферментативні білки – дезінтегрини, C-типу лектиноподібні білки, брадикінін-потенціюючі пептиди та інгібітори протеїназ Куніц-типу [5]. Багато токсинів отрути мають високу активність і специфічність до своїх молекулярних мішеней, що є важливим критерієм у розробці лікарських засобів [41]. Успішне використання компонентів зміїних отрут у фармакології підтверджується створенням таких препаратів, як каптоприл на основі брадикінін-потенціюючих пептидів з отрути *Bothrops jararaca*, а також антитромбоцитарних агентів ептіфібатиду (Integrilin®) та тирофібану (Aggrastat®) [5, 36].

Гемотоксини можна класифікувати на основі їхнього впливу: активація факторів згортання крові; антикоагулянтні агенти; інгібітори та активатори тромбоцитів; агенти, що впливають на фібриноліз; та геморагіни [18]. Отрути змії родини *Viperidae* особливо багаті на білки, які порушують систему гемостазу, діючи як прокоагулянти, що активують фактор X, протромбін і фібриноген, або як антикоагулянти, що лізують фібрин(оген), інгібують фактори згортання та перешкоджають агрегації тромбоцитів [27]. Зміїні

отрути містять металопротеази, які є фібринолітичними ферментами і належать до групи мультигенних білкових родин, задіяних у багатьох процесах фібринолізу, геморагії, апоптозу, а також мають антикоагулянтні, антитромбоцитарні та прокоагулянтні ефекти [2].

За структурою каталітичних сайтів та механізмом ферментативної дії протеолітичні ферменти поділяються на цистеїнові, треонінові, аспартатні, глутамінові протеази, металопротеази (які мають двовалентні катіони в активному центрі – найчастіше цинк, рідше кобальт або магній) та серинові протеази, де гідроксильний залишок серину разом з імідазольним кільцем гістидину та гідроксильною групою аспартату формують активний центр [42]. Ідентифікація типу протеїнази базується на використанні специфічних інгібіторів: серинові протеази розпізнаються за їхнім незворотним інгібуванням тозил-L-лізин-хлорметилкетонем, 3,4-дихлороізокумарином, діізопропілфторфосфатом та фенілметилсульфонілфторидом, тоді як металопротеази інактивуються хелатуючими агентами, такими як етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА) або 1,10-фенантролін [1, 42]. Фенілметилсульфонілфторид діє як ковалентний модифікатор активного сайту серинових ферментів, тоді як ЕДТА пригнічує металопротеази шляхом хелатування двовалентних катіонів [43]. Металопротеази потребують двовалентних йонів для своєї дії; різні фібринолітичні металопротеази можуть використовувати Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} або інші катіони як кофактори [1]. Для оцінки амідолітичної активності протеїназ використовують хромогенний метод, який базується на специфічних хромогенних пептидних субстратах плазміну (H-D-Val-Leu-Lys-pNA або подібних), tPA (H-D-Pe-Pro-Arg-pNA або подібних) та урокінази (pGlu-Gly-Arg-pNA або подібних); внаслідок ферментативної реакції від субстратів-паранітроанілідів відщеплюється хромофор пара-нітроанілін, поглинання якого вимірюється при 405 нм, а його концентрація прямо пропорційна активності протеолітичного ферменту у зразку [1].

Металопротеїнази зміїних отрут (МЗО) є Zn^{2+} -залежними ендопроотеолітичними ферментами, які класифікуються на три класи: Р-I, Р-II та Р-III [11]. МЗО здатні продукувати різноманітний спектр активностей, включаючи геморагію, прокоагулянтний, антикоагулянтний, фібринолітичний та антитромбоцитарний ефекти [2, 5]. МЗО беруть участь у фібринолізі, в активації коагуляційного процесу через протеолітичну активність, а також в активації факторів згортання, таких як фактор X та фактор II, і залучені до інгібування або індукції агрегації тромбоцитів [2]. В отрутах гадюк МЗО є одними з найбільш численних білків протеому, їх відсоток варіює від приблизно 11% до понад 65% загального білка [5, 30].

МЗО структурно поділяються на: Р-I – протеазний домен (20–30 кДа), Р-II – протеазний та дизінтегриновий домени (30–60 кДа), Р-III – протеазний, дизінтегриновий та цистеїн-багатий домени (60–100 кДа) [17]. Активний сайт металопротеїназного домену має консенсусну послідовність $HEXHXHXXGXXHD$ та «Met-turn» [30].

МЗО селективно гідролізують білки, залучені до коагуляційного каскаду, фібринолізу та функції тромбоцитів [5]. Більшість МЗО проявляють фібриногенолітичну активність [17]. Геморагічна активність МЗО характеризується гідролізом білків базальної мембрани, таких як ламінін та колаген IV типу [44, 45]. МЗО класу Р-I швидко інактивуються α_2 -макроглобуліном, тоді як геморагічні МЗО класу Р-III майже не інгібуються, що пояснює здатність останніх індукувати системну геморагію. Водночас ферменти класу Р-II характеризуються помірним ступенем стійкості до α_2 -макроглобуліну, що зумовлює їхню здатність викликати переважно локальні геморагічні прояви з мінімальним системним ефектом [30, 45].

Серинові протеїнази зміїних отрут (СПЗО) є глікопротеїнами з молекулярною масою від 25 до 70 кДа, що містять N- або O-глікозильовані сайти [46]. Вони розпізнають численні макромолекулярні субстрати та впливають на різні ланки системи гемостазу жертви: коагуляційний каскад, калікреїн-кінінову систему та активацію тромбоцитів [12]. СПЗО належать до

РА клану, родини S1, і містять консервовану каталітичну тріаду His57, Asp102 та Ser195. За субстратною специфічністю їх класифікують як трипсиноподібні, оскільки вони розщеплюють пептидні зв'язки після залишків Lys або Arg [12]. Незважаючи на високу подібність послідовностей, яка становить 50–85% ідентичності, СПЗО суттєво відрізняються за специфічністю до макромолекулярних субстратів [12]. Важливою властивістю СПЗО є їхня нечутливість до ендогенних інгібіторів серинових протеїназ (серпінів) у присутності гепарину [47].

Найбільш описаною активністю СПЗО є тромбіноподібна активність – прокоагулянтна дія, що полягає у перетворенні фібриногену у фібрин шляхом розщеплення його α та β ланцюгів [12]. На відміну від тромбіну, тромбіноподібні ферменти зміїних отрут рідко активують інші фактори згортання, зокрема фактор XIII, що призводить до утворення незшитих і нестабільних мономерів фібрину [12]. Вони не інгібуються гепарином, тому утворений фібриновий згусток є м'яким і легко піддається фібринолізу [48, 49]. Залежно від здатності гідролізувати α -, β - або обидва ланцюги фібриногену, тромбіноподібні ферменти зміїних отрут класифікують як венобін А, венобін В або венобін АВ відповідно [12].

Окрім тромбіноподібних ферментів, серед СПЗО виділяють ще окрему групу – фібриногенази, здатні розщеплювати фібриноген і сприяти розчиненню фібринових згустків. Головною перевагою використання фібриногеназ є специфічне та обмежене розщеплення фібриногену, який залишається в циркуляції крові, але зі зниженою здатністю до згортання [50]. Прикладом такого ферменту є фібриногеназа з отрути *Echis multisquamatis* – серинова протеїназа з молекулярною масою 33,2 кДа, яка спочатку специфічно розщеплює зв'язок В β R42-А43 у В β -ланцюзі фібриногену, а потім значно повільніше гідролізує С-кінець А α -ланцюга [50]. Присутність фібриногену з відсутнім N-термінальним пептидом 1–42 В β -ланцюга подовжувала тромбін-індуковану полімеризацію нативного фібриногену через формування аномальної фібринової матриці. Згустки, утворені з суміші нативного та

модифікованого фібриногену, лізувалися плазміном значно швидше, ніж нативні згустки [50]. Крім того, ця фібриногеназа не активувала тромбоцити та не спричиняла змін їхньої форми або гранулярності, проте знижувала АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів. Цей ефект пояснюється розщепленням В β N-домену фібриногену, який бере участь в агрегації тромбоцитів [50].

Серед СПЗО також виділяють активатори плазміногену – серинові протеїнази, здатні перетворювати плазміноген в активний плазмін шляхом специфічного розщеплення пептидного зв'язку між Arg561 та Val562 у плазміногені, що опосередковано спричиняє деградацію фібрину [12].

Батроксобін (Defibrase®) є тромбіноподібною сериновою протеїназою із отрути *Bothrops atrox*, що селективно розщеплює лише α -ланцюг фібриногену, утворюючи менш зшитий фібрин порівняно з фібрином, утвореним тромбіном. Препарат Defibrase® клінічно використовується у пацієнтів із тромбозом, інфарктом міокарда, захворюваннями периферичних судин та гострою ішемією як дефібриногенуючий агент [12, 46]. У клінічних дослідженнях Дефібраза була ефективною у індукції тромболізису та реканалізації коронарних артерій з низьким ризиком кровотечі [36].

Фібринолітична активність в отрутах гадюкових змій була вперше описана в 1956 році. Було встановлено, що ця активність діє безпосередньо на фібрин і незалежно від активації ендогенної фібринолітичної системи [5]. МЗО мають пряму фібрин(оген)олітичну активність – їхнім основним субстратом є фібрин(оген), чий $\text{A}\alpha$ -ланцюг швидко деградує незалежно від активації плазміногену [5]. Більшість фібрин(оген)олітичних ферментів є металопротеїназами, які селективно розщеплюють α -ланцюги фібрин(оген)у і називаються α -фібриногеназами [5, 41].

МЗО не інгібуються серпінами сироватки крові, що є однією з основних переваг антитромботиків на їх основі [27]. Фібриноген, надрізаний у своєму αC -доміні металопротеїназами зміїних отрут, утворює пухкий фібриновий згусток, більш схильний до лізису. αC -домени фібриногену виконують

важливу функцію у латеральній агрегації протофібрил та містять сайти зв'язування для фібронектину, фактора XIII, плазміногену та tPA [27].

Фібриногенолітична та фібринолітична активність МЗО має високу медичну значущість, оскільки ці білки можуть використовуватися для лікування гіперфібриногенемії – фактора ризику ішемічного інсульту та захворювань периферичних артерій [18].

Сучасне тромболітичне втручання досягається за допомогою активаторів плазміногену, але ціною ризику кровотечі через непряму активацію плазміну. Тому прямодіючі фібринолітичні агенти можуть мати переваги [5, 7]. Субстратна специфічність таких МЗО повинна бути обмежена фібрином, а деградація стінки судини має бути відсутньою для уникнення геморагій [5].

Окрім прямої фібринолітичної дії, деякі МЗО здатні порушувати функцію тромбоцитів шляхом протеолітичного розщеплення адгезійних рецепторів на поверхні тромбоцитів та їхніх лігандів. Тромбоцити є основними мішенями МЗО у порушенні гемостазу: інгібуючи взаємодію тромбоцитів з колагеном та/або vWF через різні механізми, МЗО ефективно порушують процеси адгезії та агрегації тромбоцитів [51]. Зокрема, металопротеїназа кістомін, виділена з отрути *Calloselasma rhodostoma*, специфічно інгібує vWF-індуковану агрегацію тромбоцитів через зв'язування та розщеплення тромбоцитарного GPIIb та vWF [15]. Кістомін також розщеплює GPVI та значно порушує адгезію тромбоцитів до колагену, лише незначно впливаючи на адгезію до фібриногену [52]. Протеолітичне розщеплення мембранних адгезійних рецепторів тромбоцитів є незворотним і стійко змінює функцію клітин, що обумовлює антитромбоцитарний ефект МЗО [14]. Таким чином, біфункціональні МЗО, що поєднують фібринолітичну та антитромбоцитарну активності, мають подвійний терапевтичний потенціал: вони спрямовані як на фібринову складову тромбу, так і на тромбоцитарний компонент тромбоутворення.

Фібролаза – цинкова металопротеїназа з молекулярною масою 23 кДа з отрути *Agkistrodon contortrix contortrix* – діє безпосередньо на фібриноген та

фібрин і переважно розщеплює α - та β -ланцюги [3, 5, 30, 36]. Альфімепраза – рекомбінантна форма фібролази – виявилась значно потужнішою за активатори плазміногену: лізис тромбу відбувається до 6 разів швидше [30]. Альфімепраза досягла I–III фаз клінічних випробувань, але не досягла очікуваних кінцевих точок, можливо через нездатність зв'язуватися з фібрином [3, 5, 11].

Анкрод розщеплює α -ланцюг фібриногену, але, на відміну від тромбіну, не чутливий до інгібування плазмовими інгібіторами. Анкрод також активує ендогенну фібринолітичну систему та знижує в'язкість крові [13].

Муталізін-II є негеморагічною α -фібриногеназою, що індукувала безпечну реканалізацію мікросудин *in vivo* без схильності до кровотечі [14]. Муталізін-II дозо- та часозалежно інгібує агрегацію тромбоцитів, розщеплює vWF та GPVI [14]. Муталізін-II нейтралізується α_2 -макроглобуліном і має короткий період напіввиведення (близько 12 хвилин), що є ідеальними характеристиками для тромболітичного агенту [14].

Барнеттлізін-I є прямодіючою фібринолітичною протеїназою з отрути *Bothrops barnetti*, яка розщеплює переважно α -ланцюги фібрин(оген)у [7]. Специфічна фібринолітична активність барнеттлізину-I є в 1,9 рази вищою, ніж у плазміну [7]. Барнеттлізін-I має біфункціональну активність: він спрямований на тромб-релевантні молекули (фібрин(оген), vWF), але не на молекули стінки судини (ламініни, колаген). Він селективно розщеплює GPIb та інтегрин $\alpha_2\beta_1$ на тромбоциті, посилюючи тромболітичний ефект [7].

VaF1 – негеморагічна P-IIIa фібриногенолітична металопротеїназа з отрути *Vipera ammodytes ammodytes* – селективно розщеплює A α -ланцюг фібриногену і є виключно α -фібриногеназою [27].

Vipera berus (звичайна гадюка) має широкий ареал, що охоплює більшу частину Європи та простягається до Східної Азії. *Vipera berus berus* є найбільш широко розповсюдженою гадюкою в Європі [17]. *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii* – є єдиними отруйними зміями на території України [16].

Отрута *Vipera berus berus* містить білки та пептиди, що належать до 10–15 родин токсинів [53]. Відносний вміст основних білкових родин в отруті *Vipera berus berus* становить: серинові протеїнази – 31%, металопротеїнази – 19%, натрійуретичні пептиди – 11%, фосфоліпази А2 – 10%, цистеїн-багаті секреторні білки – 8%, С-типу лектиноподібні білки – 2%, L-амінокислотні оксидази – 2%, дизінтегрини – 1% [17].

Отрута європейської гадюки має переважно гемотоксичну дію та спричиняє аномальне згортання крові [18]. Дослідження впливу отрут *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii* на гемостаз щурів виявило, що отруєння *Viperidae* може активувати фібриноліз. Активність плазміну була підвищена в обох групах. Такий профібринолітичний ефект може бути пов'язаний як з підвищеною активністю плазміну, так і зі зниженою активністю α_2 -антиплазміну [16].

Раніше з отрути *Vipera berus berus* була виділена геморагічна металопротеїназа, що гідролізує казеїн і фібриноген та розщеплює А α -ланцюг фібриногену [54]. Також було охарактеризовано металопротеїназу з фактор Х-активуючою та фібриногенолітичною активностями, що складається з двох однакових ланцюгів (59 кДа) і гідролізує фібриноген, але неактивна щодо фібрину, плазміногену та протромбіну [20]. Водночас, МЗО з фібринолітичною та антитромбоцитарною активністю, які могли б бути перспективними тромболітичними агентами, з отрути *Vipera berus berus* детально не охарактеризовані, що обумовлює актуальність даного дослідження.

Висока складність та значна ферментативна активність отрути *Vipera berus* вказують на її перспективність як джерела нових біоактивних агентів [53]. Знання протеому отрути та біологічних властивостей окремих компонентів може становити цінне джерело нових лікарських засобів [18].

Зміїна отрута містить фібринолітичні ферменти, які розщеплюють фібрин-багаті тромби та запобігають утворенню додаткових згустків [36]. Рекомбінантно вироблені МЗО досліджуються як альтернатива існуючим

тромболітикам завдяки їхній високій фібринолітичній активності [5]. Триваючі дослідження серинових протеаз та МЗО надають можливість для розробки нових антитромботичних препаратів [13]. Молекули зі зміїної отрути залишаються перспективним джерелом нових лікарських засобів завдяки їхній високій селективності, стабільності та ефективності [36].

Таким чином, отрута *Vipera berus berus*, що містить 19% металопротеїназ та має виражену гемотоксичну дію з фібриногенолітичною та профібринолітичною активністю [16, 17], є перспективним, але недостатньо вивченим джерелом потенційних тромболітичних агентів. Враховуючи успішні приклади характеристики негеморагічних фібринолітичних МЗО з антитромбоцитарною активністю з отрут інших гадюкових змій, зокрема муталізину-II з отрути *Lachesis muta muta* [14] та кістоміну з отрути *Calloselasma rhodostoma* [15], детальне дослідження протеїнази з отрути *Vipera berus berus* із фібрин(оген)олітичною активністю, її специфічності щодо молекули фібриногену, впливу на полімеризацію фібрину та агрегацію тромбоцитів є актуальним завданням для оцінки її потенціалу як тромболітичного агенту.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та реактиви

Використовували реактиви аналітичної чистоти: акриламід, біс-акриламід, гліцин, етанол, персульфат амонію (АПС), хлорид натрію, сульфат барію, Кумассі R-250, 4-(2-гідроксіетил)-1-піперазинетансульфонову кислоту (HEPES), АДФ, тритон X-100, 4-хлоро-1-нафтол, нітроцелюлозні мембрани, Q-сефарозу, колаген із діагностичного набору, мишачі моноклональні антитіла (МКА) та вторинні козячі антитіла проти імуноглобулінів миші, кон'юговані з пероксидазою хрому, а також стандартні суміші маркерних білків для електрофорезу (MilliporeSigma, США); сахарозу, ізопропанол, β -меркаптоетанол (β -МЕ), оцтову кислоту, гідроксид натрію, хлорид калію, сульфат натрію, додецилсульфат натрію (ДСН), трис-(гідроксиметил)-амінометан (Tris), бромфеноловий синій, цитрат натрію, хлорид кальцію, хлорид магнію, глюкозу, знежирене сухе молоко (Bio-Rad Laboratories, США); соляну кислоту, перекис водню, натрій фосфат двозаміщений, калій фосфат однозаміщений та тромбін із питомою активністю 50 од./мг (Merck, Німеччина); тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД; Renal, Угорщина).

Буферні розчини готували безпосередньо перед використанням. Розподільчий буфер (рН 8,8): 22,71 г Tris, 0,5 г ДСН і 1 мл ТЕМЕД, доведені водою до 250 мл. Концентруючий буфер (рН 6,8): 3,029 г Tris, 0,2 г ДСН і 0,4 мл ТЕМЕД у 100 мл. 40 % розчин акриламід: 40 г акриламід з 1,08 г біс-акриламід у 100 мл води, перед застосуванням фільтрували. Електродний буфер (рН 8,5): 6 г Tris, 28,8 г гліцину і 1 г ДСН у 1 л води. Барвник для виявлення білкових зон: 2,5 г Кумассі R-250 у 10 мл етанолу, 15 мл ізопропанолу і 10 мл оцтової кислоти. 1,5 % АПС (150 мг/10 мл) готували

щоразу заново перед полімеризацією гелю. Буфер для зразків: 0,4 мг ДСН, 1 мг сахарози та слідова кількість бромфенолового синього. Фосфатно-сольовий буфер (рН 7,4): 8 г NaCl, 0,2 г KCl, 1,44 г Na₂HPO₄ та 0,24 г KH₂PO₄ у 1 л води. HEPES-буфер для відмитих тромбоцитів (рН 7,4): 5 мМ HEPES, 0,145 М NaCl, 2,7 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂ та 5 мМ глюкози. 0,1 М гліциновий буфер (рН 8,3) для інкубації гелів після ензим-електрофорезу. 2,5% розчин тритону X-100 для ренатурації білків у гелі. Додатково використовували 0,05 М Tris-HCl буфер (рН 7,4) з 0,13 М NaCl, 5 % оцтову кислоту, 16 % розчин сульфату натрію (160 г/л) та гліциновий буфер (7,5 г гліцину і 5,8 г NaCl на літр, рН 9,0 доводили 1 М NaOH).

Плазму крові донорів надано співробітниками Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України. Досліджувану протеїназу з отрути *Vipera berus berus* одержували іонообмінною хроматографією на колонці з Q-сефарозою.

МКА II-5C до N-кінцевих ділянок A α -ланцюга фібриногену та 2d-2a до N-кінцевих ділянок B β -ланцюга фібриногену були надані відділом структури та функції білка Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України.

2.2. Отримання плазми крові людини

Забір крові у донорів проводили вранці натщесерце з використанням сухої голки великого діаметру без шприца. Перші 5–6 крапель, що виходили з голки, видаляли як потенційно контаміновані тканинним тромбопластином. Далі кров одразу змішували з попередньо внесеним у поліетиленову пробірку 3,8% розчином цитрату натрію у співвідношенні 9:1 (кров до антикоагулянту). Пробірку щільно закривали та обережно перемішували повільними обертальними рухами, уникаючи різких струшувань, що можуть спричинити небажану активацію тромбоцитів. Відділення плазми від клітинної фракції здійснювали центрифугуванням за прискорення 1200–1400 g упродовж 10 хв.

Отриманий супернатант переносили у чисту поліетиленову пробірку та зберігали за температури $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до моменту подальшого використання.

2.3. Виділення та очистка фібриногену

Фібриноген очищали багатоступеневим фракціонуванням плазми крові. На першому етапі видаляли вітамін К-залежні компоненти коагуляційного каскаду – протромбін, фактори VII, IX, X та протеїн С – адсорбцією на сульфаті барію: охолоджену до $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ плазму насичували BaSO_4 (30 г/л) за постійного перемішування, витримували 1 год і центрифугували (1300 g, 10 хв). Процедуру повторювали двічі.

Плазму поступово нагрівали на водяній бані до кімнатної температури (не вище $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) і додавали 1 М гліциновий буфер (pH 9,0) у співвідношенні 1/10 об'єму. Денатуровані білки висолювали 16 % Na_2SO_4 , який вносили малими порціями за безперервного перемішування, і відокремлювали центрифугуванням (1300 g, 30 хв, кімнатна температура). З надосаду фібриноген осаджували повторним внесенням 16 % Na_2SO_4 за тих самих умов, але за $10\text{--}15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Преципітат розчиняли у 0,2 М NaCl (250 мл на осад з 1 л плазми) і переосаджували рівним об'ємом 16 % Na_2SO_4 . Очищену фракцію розчиняли у 0,15 М NaCl за кімнатної температури, заморожували та зберігали при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4. Визначення концентрації білків

Кількісну оцінку білка у розчинах проводили методом ультрафіолетової спектрофотометрії. Вимірювання виконували на спектрофотометрі СФ-46 у кварцових кюветах з оптичним шляхом 1 см. Оптичну густину фіксували одночасно на двох довжинах хвиль – 280 і 320 нм; сигнал при 320 нм, що

характеризує фонове світлорозсіювання за рахунок нерозчинних домішок, віднімали від показника при 280 нм для отримання скоригованого значення поглинання.

Молярну концентрацію фібриногену розраховували з використанням закону Бера–Ламберта:

$$C = \frac{A}{\epsilon l}$$

де C – молярна концентрація протеїна, M (моль/л);

A – оптична густина;

ϵ – коефіцієнт молярної екстинкції конкретного протеїна ($M^{-1}cm^{-1}$);

l – довжина оптичного шляху кювети в см.

2.5. Аналіз отриманих білкових зразків методом електрофорезу у поліакриламідному гелі

Електрофоретичний аналіз білкових зразків виконували у поліакриламідному гелі (ПААГ) за Лемлі у Tris-гліциновій буферній системі [55]. Гель мав двошарову структуру: верхній концентруючий (4 %) та нижній розподільчий (10 %). Розподільчий гель готували із суміші 3 мл розподільчого буферу, 1,425 мл дистильованої води, 1,5 мл 40 % акриламідну та 0,075 мл 1,5 % АПС; концентруючий – з 1 мл відповідного буферу, 0,7 мл води, 0,2 мл акриламідну та 0,1 мл ініціатора полімеризації. Міграцію забезпечували постійним струмом – 19 мА на стадії концентрування та 36 мА під час розділення.

Проби готували змішуванням білкового розчину (2 мг/мл) з буфером для зразків (2 % ДСН, 5 % сахароза, бромфеноловий синій як маркер фронту); для відновлених зразків додатково вносили 0,2 % β -МЕ. Суміш прогрівали у

киплячій водній бані 3 хв. Після електрофорезу гель занурювали у розчин Кумассі R-250 (0,01 % у 25 % ізопропанолі з 10 % оцтовою кислотою) на 10 хв, надлишок барвника відмивали 5 % оцтовою кислотою. Чутливість методу – 1 мкг білка на доріжку. Молекулярну масу смуг визначали зіставленням з комерційними маркерами (Fermentas AG, 0671).

2.6. Умови проведення обмеженого протеолізу фібриногену

Реакцію обмеженого протеолізу фібриногену запускали у 0,05 М Tris-HCl буфері (рН 7,4) з 0,13 М NaCl за температури 25 °С. Вихідну концентрацію субстрату встановлювали на рівні 1,5 мг/мл, а досліджуваний ензим вносили до кінцевого вмісту 0,01 мг/мл. У фіксовані моменти часу – через 10, 30, 60 і 90 хв від моменту додавання ферменту – відбирали аліквоти реакційної суміші. Гідроліз зупиняли негайним змішуванням відібраної проби з буфером для електрофорезу (2% ДСН, 5% сахароза, 0,2% β -МЕ) і наступним прогріванням у киплячій водній бані протягом 3 хв. Підготовлені зразки аналізували у 10 та 12% ПААГ за стандартною методикою Лемлі з фарбуванням гелів барвником Кумассі R-250.

2.7. Турбідиметричний аналіз полімеризації фібрину

Кінетику формування фібринового згустку відстежували у режимі реального часу за зростанням світлорозсіювання реакційної суміші на довжині хвилі 350 нм. Спектрофотометричну кювету наповнювали послідовно: спочатку вносили 0,05 М Tris-HCl буфер (рН 7,4), що містив 0,13 М NaCl та 5 мМ CaCl₂, потім – пробу фібриногену (нативного або попередньо інкубованого з досліджуваною протеїназою) до сумарної концентрації білка 1 мг/мл. Полімеризацію ініціювали внесенням тромбіну до кінцевої

концентрації 1 НН/мл, після чого одразу розпочинали реєстрацію кривої зміни мутності. Як аналітичні параметри кривої розглядали тривалість лаг-фази, амплітуду максимальної мутності та час виходу показника на плато.

2.8. Оцінка агрегації тромбоцитів

Агрегаційну відповідь тромбоцитів оцінювали на агрегометрі SOLAR AP2110 у збагаченій тромбоцитами плазмі (ЗТП).

Для отримання ЗТП цитратну кров донорів центрифугували за прискорення 200 g упродовж 10 хв за кімнатної температури. Верхню фракцію, що містила тромбоцити, обережно відбирали у чисту поліетиленову пробірку, уникаючи захоплення лейкоцитарно-еритроцитарного шару. Концентрацію тромбоцитів стандартизували до $200\text{--}250 \times 10^9/\text{л}$.

У вимірювальну кювету агрегометра вносили 270 мкл ЗТП та досліджувану протеїназу до кінцевої концентрації 0,01 або 0,02 мг/мл. Контрольну пробу готували аналогічно, але без додавання ензиму. Суміш інкубували 5 хв при 37°C безпосередньо у кюветі за постійного перемішування магнітною мішалкою. Запуск агрегації забезпечували внесенням розчину АДФ до кінцевої концентрації 12,5 мкМ. Зміни світлопропускання реєстрували впродовж 7 хв; ступінь агрегаційної відповіді виражали у відсотковому співвідношенні до максимального сигналу.

2.9. Імунодетекція продуктів протеолізу фібриногену та фібрину методом вестерн-блот

Імунохімічну ідентифікацію продуктів протеолізу фібриногену та фібрину виконували методом вестерн-блотингу [55]. Білки попередньо

розділяли електрофорезом у ПААГ з ДСН за відновлюючих умов і переносили на нітроцелюлозну мембрану електроблотингом.

Мембрану блокували 5 % знежиреним сухим молоком у фосфатно-сольовому буфері 1 год для насичення неспецифічних сайтів зв'язування, потім інкубували з мишачими МКА 1 год. Імунні комплекси візуалізували вторинними козячими антитілами проти імуноглобулінів миші, кон'югованими з пероксидазою хрому. Кольорову реакцію розвивали у свіжоприготовленій суміші 0,001 М 4-хлоро-1-нафтолу та 0,03 % перекису водню у 0,5 М Tris-HCl буфері (рН 7,5) до появи чітко окреслених смуг.

2.10. Оцінка протеолітичної активності методом ензим-електрофорезу

Локалізацію протеолітично активних ферментів у складі білкових сумішей визначали методом ензим-електрофорезу [56]. 12% ПААГ полімеризували з одночасним включенням у його матрицю фібриногену в концентрації 0,5 мг/мл, який виконував функцію вбудованого субстрату. Після електрофоретичного розділення за Лемлі гель відмивали від залишків ДСН трьома послідовними занурюваннями у 2,5% розчин тритону X-100 (по 30 хв кожне) для ренатурації білків, після чого переносили у 0,1 М гліциновий буфер (рН 8,3) для інкубації протягом 12 год. Ділянки ферментативного розщеплення субстрату проявлялися після фарбування гелю розчином Кумассі R-250 у вигляді прозорих світлих зон на рівномірно забарвленому фоні.

2.11. Очищення протеїнази з отрути *Vipera berus berus*

Очищення протеїнази з отрути *Vipera berus berus* виконували методом аніонообмінної хроматографії на Q-сефарозі. Колонку об'ємом 12,5 мл

урівноважували 0,05 М Tris-HCl буфером (рН 8,9). Зразок отрути наносили на колонку, після чого адсорбовані білки елюювали тим самим буфером зі ступінчастим градієнтом NaCl – 0,1; 0,2; 0,3 та 0,5 М (рН 8,9). Швидкість потоку становила 1 мл/хв. Хроматографічне розділення проводили на системі Acta Prime (Acta, США).

2.12. Статистична обробка результатів дослідження

Статистичну обробку експериментальних даних проводили із застосуванням стандартних пакетів прикладних програм Microsoft Excel та OriginPro 2024. Усі дослідження виконували щонайменше у трьох незалежних повторях. Побудову графіків та апроксимацію кінетичних кривих здійснювали засобами OriginPro.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Виділення та характеристика протеїнази

Цільну отруту розчиняли у 0,05 М Tris-HCl буфері (рН 7,4) і наносили на колонку з аніонообмінним сорбентом Q-сефароза, врівноважену тим самим буфером. Зв'язані компоненти отрути послідовно елюювали ступінчастим градієнтом натрію хлориду – 0,1; 0,2; 0,3 та 0,5 М у вихідному буфері. У результаті фракціонування цільову протеїназу було локалізовано в елюаті 0,2 М натрію хлориду, який і було відібрано для використання у подальших експериментах.

Використання ступінчастого градієнта натрію хлориду замість лінійного дозволило отримати більш чітке розділення компонентів отрути та спростити процедуру виділення цільового білка. Відібрану фракцію було сконцентровано та проаналізовано на наявність протеолітичної активності, що підтвердило присутність цільового ферменту саме у цьому елюаті. Для подальшої характеристики отриманого білкового препарату, а саме оцінки його чистоти та визначення молекулярної маси, було застосовано метод електрофорезу у ПААГ з ДСН.

При електрофоретичному розділенні цієї фракції у ПААГ з ДСН (рис. 3.1) видно одну основну виражену білкову смугу. Положення основної смуги відносно стандартів молекулярної маси відповідало значенню близько 55 кДа. Слабші смуги, помітні нижче основної, ймовірно відповідають незначним білковим домішкам або продуктам часткової деградації цільового білка.

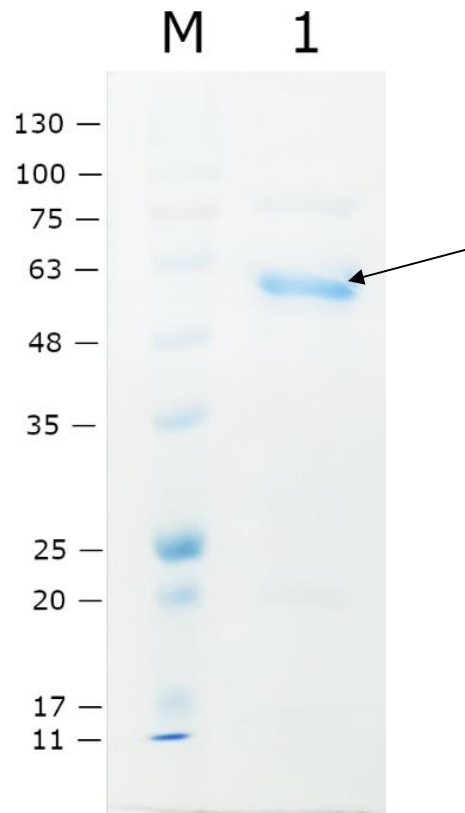


Рис. 3.1. Електрофореграма розділення фракції, отриманої шляхом розділення цільної отрути *Vipera berus berus* методом аніонообмінної хроматографії на колонці Q-сефароза у 0,05 М Tris-HCl буфері, рН 7,4; М – набір стандартів молекулярної маси (кДа), 1 – досліджувана проба; стрілкою вказано основний протеїновий компонент

Чи відповідає основна смуга на електрофореграмі справді протеолітично активному ензиму, перевіряли методом ензим-електрофорезу з фібриногеном як субстратом (рис. 3.2). У досліджуваному зразку проявлялася одна чітка зона лізису субстрату; її положення збігалось з положенням основної білкової смуги на електрофореграмі, тобто відповідало приблизно 55 кДа. Інших зон протеолітичної активності у гелі не виявлено. Збіг положення активної зони з основною білковою смугою додатково підтверджує, що цільовий ензим становить переважну частину виділеного матеріалу.

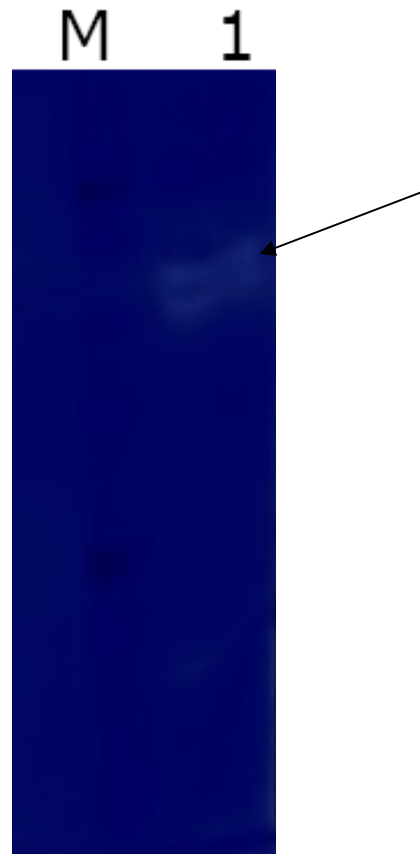


Рис. 3.2. Ензим-електрофореграма фракції, отриманої шляхом розділення цільної отрути *Vipera berus berus* методом аніонообмінної хроматографії на колонці Q-сефароза у 0,05 М Tris-HCl буфері, рН 7,4; М – набір стандартів молекулярної маси (кДа), 1 – досліджувана проба; стрілкою вказано зону протеолітичної дії

Отже, отримана фракція містить протеїназу з молекулярною масою близько 55 кДа, яка зберігає протеолітичну активність щодо фібриногену в умовах електрофоретичного розділення. Для встановлення класу цієї протеїнази було застосовано підхід із селективними інгібіторами (рис. 3.3). Фібриноген у концентрації 1,5 мг/мл інкубували з ензимом (0,01 мг/мл) упродовж 20 хв за трьох умов: без інгібіторів, у присутності бензамідину (0,016 М) як інгібітора серинових протеїназ та у присутності ЕДТА (0,016 М), що хелатує двовалентні катіони і блокує активність металопротеїназ. Продукти реакції розділяли електрофорезом у ПААГ за відновлювальних умов.

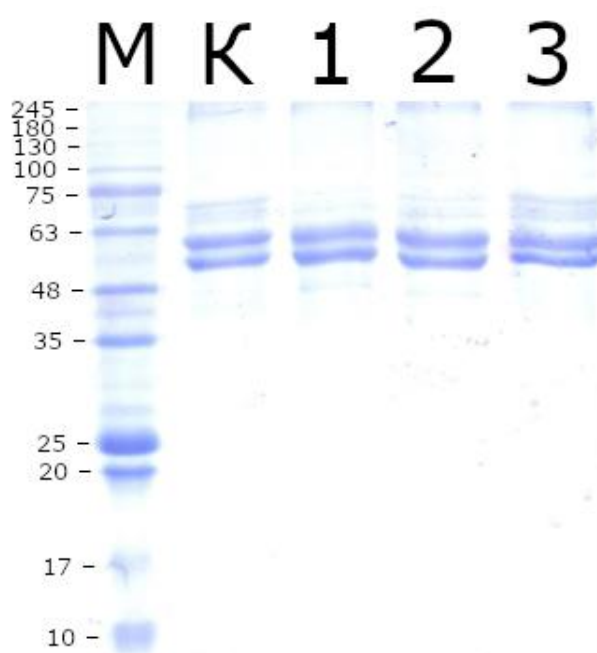


Рис. 3.3. Електрофореграма розділення фібриногену та продуктів його гідролізу після інкубації з протеїназою з отрути *Vipera berus berus* за наявності селективних інгібіторів: М – маркери молекулярної маси (кДа); К – негідролізований фібриноген (контроль); 1 – продукти гідролізу фібриногену протеїназою (тривалість інкубації – 20 хв, концентрація ензиму – 0,01 мг/мл); 2 – продукти гідролізу за тих самих умов у присутності бензамідину (0,016 М); 3 – продукти гідролізу за тих самих умов у присутності ЕДТА (0,016 М); зразки готували у присутності 0,2% β -МЕ

Контрольна доріжка демонструвала характерний профіль трьох смуг негідролізованого фібриногену, що відповідають $A\alpha$ -, $B\beta$ - та γ -ланцюгам. У пробі з ензимом без інгібіторів (доріжка 1) інтенсивність смуги $A\alpha$ -ланцюга помітно знижувалася, тоді як смуги $B\beta$ - та γ -ланцюгів зберігалися. Бензамідин (доріжка 2) профіль гідролізу не змінював – смуга $A\alpha$ -ланцюга залишалася такою ж розмитою, як і у пробі з вільним ензимом. Натомість за присутності ЕДТА (доріжка 3) профіль фібриногенових ланцюгів відповідав контрольному, тобто розщеплення $A\alpha$ -ланцюга було пригнічене.

Такий характер інгібування свідчить про належність ензиму до металопротеїназ: нечутливість до бензамідину виключає серинову природу каталітичного центру, а втрата активності у присутності ЕДТА вказує на

залежність від двовалентних катіонів, найімовірніше Zn^{2+} . Ця властивість разом з молекулярною масою ~ 55 кДа та вибіркоvim гідролізом А α -ланцюга фібриногену дає підстави віднести ензим до МЗО класу Р-II.

3.2. Аналіз субстратної специфічності протеїнази

Для уточнення специфічності ензиму щодо окремих поліпептидних ланцюгів фібриногену застосовували електрофорез у ПААГ в присутності ДСН за відновлювальних умов (рис. 3.4). Фібриноген інкубували з ензимом у кінцевих концентраціях 0,01 та 0,02 мг/мл протягом 20 хв при 37 °С. Реакцію зупиняли додаванням буферу для зразків з β -МЕ. Контрольну пробу готували аналогічно, але без додавання ензиму.

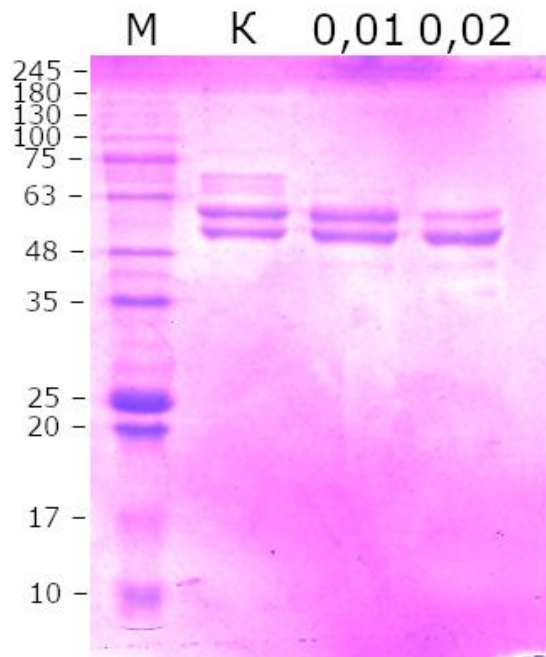


Рис. 3.4. Електрофореграма продуктів гідролізу фібриногену протеїназою з отрути *Vipera berus berus* за відновлювальних умов: М – маркери молекулярної маси (кДа); К – негідролізований фібриноген (контроль); 0,01 і 0,02 – фібриноген, інкубований з ензимом у кінцевих концентраціях 0,01 та 0,02 мг/мл відповідно

Контрольний зразок мав типовий профіль негідролізованого фібриногену у вигляді трьох основних смуг, що відповідали А α -ланцюгу (\approx 66 кДа), В β -ланцюгу (\approx 54 кДа) та γ -ланцюгу (\approx 48 кДа). У пробах з ензимом інтенсивність смуги А α -ланцюга зменшувалася дозозалежно: за концентрації 0,01 мг/мл смуга помітно слабшала, а за 0,02 мг/мл – практично зникала. Смуги В β - та γ -ланцюгів натомість зберігали інтенсивність, близьку до контрольної. Нижче γ -ланцюга у дослідних пробах з'являлися додаткові дифузні смуги, які відповідали низькомолекулярним продуктам розщеплення А α -ланцюга.

Електрофоретичні дані доповнили імуноблот-аналізом з використанням МКА, специфічних до окремих ділянок молекули фібриногену. Продукти інкубації фібриногену з ензимом (15, 30, 45, 60 та 90 хв) розділяли електрофорезом у відновлювальних умовах, переносили на нітроцелюлозну мембрану та виявляли за допомогою МКА П-5С (N-кінцеві ділянки А α -ланцюга, рис. 3.5) і МКА 2d-2a (N-кінцеві ділянки В β -ланцюга, рис. 3.6).

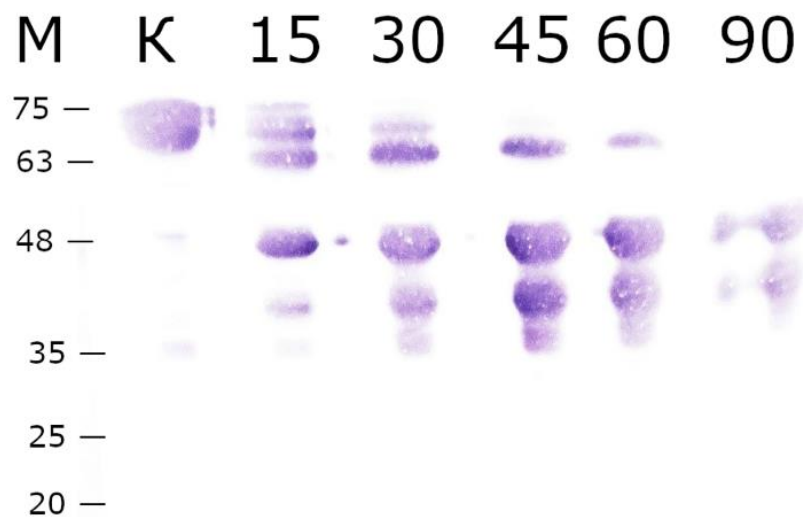


Рис. 3.5. Блотограма продуктів гідролізу фібриногену протеїназою з отрути *Vipera berus berus* із застосуванням моноклональних антитіл П-5С, специфічних до N-кінцевих ділянок А α -ланцюга фібриногену: М – маркери молекулярної маси (кДа); К – негідролізований фібриноген (контроль); 15, 30, 45, 60, 90 – проби, що відповідають тривалості інкубації з ензимом

15, 30, 45, 60 і 90 хв відповідно; електрофорез проводили за відновлювальних умов;

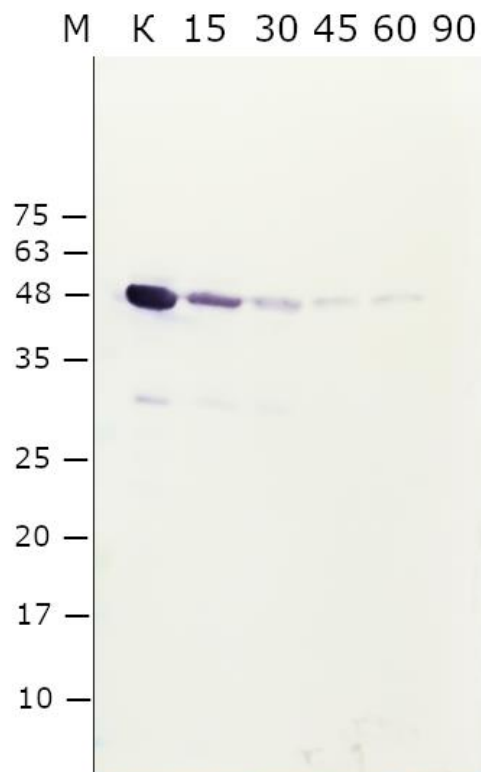


Рис. 3.6. Блотограма продуктів гідролізу фібриногену протеїназою з отрути *Vipera berus berus* із застосуванням моноклональних антитіл 2d-2a, специфічних до N-кінцевих ділянок В β -ланцюга фібриногену: М – маркери молекулярної маси (кДа); К – негідролізований фібриноген (контроль); 15, 30, 45, 60, 90 – проби, що відповідають тривалості інкубації з ензимом 15, 30, 45, 60 і 90 хв відповідно, електрофорез проводили за відновлювальних умов

На блотограмі з МКА П-5С (рис. 3.5) уже з 15-ї хв інкубації інтенсивність смуги нативного А α -ланцюга знижується, а з'являються імунореактивні продукти з молекулярними масами ~60, 48 і 40 кДа. Збереженість N-кінцевого епітопу у складі цих фрагментів свідчить про локалізацію сайту розщеплення у С-кінцевій частині А α -ланцюга. Гідроліз В β -ланцюга, що детектується МКА 2d-2a (рис. 3.6), за зіставних умов відбувається помітно повільніше; γ -ланцюг лишається інтактним протягом усього періоду спостереження.

Селективне розщеплення А α -ланцюга без помітного впливу на В β - та γ -ланцюги характерне для МЗО класу Р-І, які атакують доступні петлеві ділянки та α С-домен А α -ланцюга. Збереженість γ -ланцюга важлива для інтерпретації функціональних тестів: його С-кінець містить послідовність ННLGGAКQAGDV, що опосередковує зв'язування фібриногену з рецепторами GРІІЬ/ІІа тромбоцитів, а сайти полімеризації «а» та «b» в центральному Е-доміні також лишаються інтактними. Завдяки цьому частково гідролізований фібриноген зберігає здатність до тромбін-індукованої полімеризації та взаємодії з тромбоцитами. Водночас втрата α С-доменів, які забезпечують латеральне зшивання протофібрил і містять Arg-Gly-Asp послідовність (α 572–574) для зв'язування з активованими інтегринами, обмежує функціональну повноцінність модифікованого субстрату.

З огляду на це у наступних експериментах із полімеризації фібрину та агрегації тромбоцитів час попередньої інкубації фібриногену з ензимом скорочували порівняно з 20 хв електрофоретичного аналізу – щоб зберегти достатню частку частково модифікованого субстрату й оцінити функціональні наслідки саме часткової, а не повної деградації А α -ланцюга.

3.3. Оцінка полімеризації фібрину за дії протеїнази

Наступним етапом було дослідження того, як попередня дія протеїнази на фібриноген відображається на його тромбін-індукованій полімеризації. Фібриноген інкубували з ензимом у концентраціях 0,01 та 0,02 мг/мл, після чого до проб додавали тромбін та йони Ca²⁺ й турбідиметрично реєстрували зміну оптичної густини у часі. Контролем слугував необроблений фібриноген.

Результати турбідиметричного аналізу (рис. 3.7) демонструють вплив попередньої обробки фібриногену протеїназою на основні параметри його тромбін-індукованої полімеризації — тривалість лаг-періоду, швидкість росту оптичної густини та її максимальне значення. Ці параметри відображають

різні етапи процесу формування фібринового згустка: лаг-період відповідає стадії відщеплення фібринопептидів та утворення протофібрил, а наступне зростання оптичної густини — латеральній асоціації протофібрил у фібринові волокна.

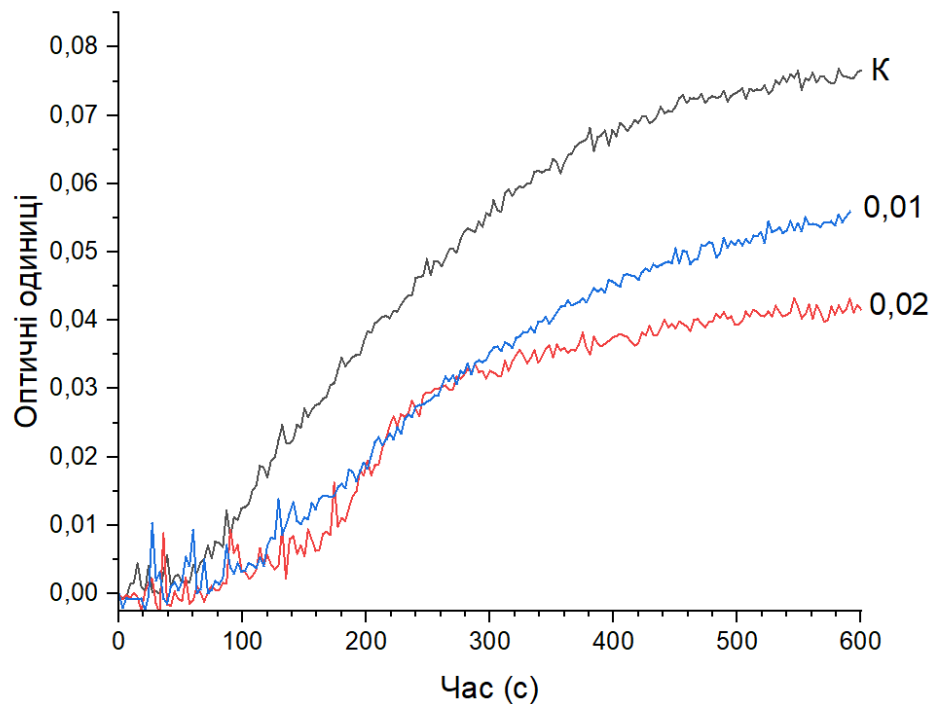


Рис. 3.7. Турбідиметричні криві, що відображають дію протеїнази з отрути *Vipera berus berus* на тромбін-індуковану полімеризацію фібрину; оптичну щільність реєстрували за довжини хвилі 350 нм після внесення тромбіну (1 НН/мл) до проб фібриногену (1 мг/мл): контроль без додавання ензиму (K); за наявності протеїнази у концентрації 0,01 мг/мл (0,01) та 0,02 мг/мл (0,02)

Криві контрольної та дослідних проб помітно відрізнялися. У контрольній пробі з нативним фібриногеном оптична густина швидко наростала і до 500–600-ї с виходила на плато на рівні ~0,075 од. У зразках, попередньо оброблених ензимом, початок приросту мутності відтермінувався на 50–150 с, а сам приріст відбувався повільніше. Висота плато виявилася нижчою: ~0,055 од. за концентрації ензиму 0,01 мг/мл і

~0,042 од. за 0,02 мг/мл – майже вдвічі менше за контроль. Ефект мав чіткий дозозалежний характер.

Зниження максимального рівня оптичної густини відображає не лише кількісне зменшення утвореного фібрину, а й якісні зміни архітектури фібринової сітки. Згідно з принципами турбідиметрії, інтенсивність світлорозсіювання пропорційна товщині фібринових волокон, тож дворазове зниження плато свідчить про формування тонших фібрил і пухкшою, пористою полімерною структурою. Подовження лаг-фази вказує на уповільнення латеральної агрегації протофібрил – критичної стадії дозрівання повноцінного згустку.

Ці результати узгоджуються з даними електрофорезу, який виявив селективний гідроліз α C-доменів $A\alpha$ -ланцюга. Відщеплення C-кінцевих ділянок α -ланцюга, ключових для міжмолекулярних взаємодій під час зшивання протофібрил, призводить до утворення дефектних мономерів фібрину. Вони зберігають здатність до первинної лінійної полімеризації, проте формувати міцні поперечні зв'язки практично не можуть – це й пояснює характер турбідиметричних кривих у дослідних зразках.

Формування дефектної високопористої сітки з тонкими волокнами робить такий згусток менш стійким до гемодинамічних навантажень, зокрема сил зсуву кровотоку. Водночас пухка структура полегшує дифузю ендогенних фібринолітиків (tPA, плазміну) всередину тромбу, що теоретично має пришвидшувати його лізис.

3.4. Оцінка агрегації тромбоцитів за дії протеїнази

Функціональну повноцінність частково гідролізованого фібриногену перевіряли також у тесті на агрегацію тромбоцитів. На відміну від попереднього експерименту з очищеним фібриногеном, у цій серії дослідів використовували ЗТП, що являє собою більш фізіологічне середовище і

містить повний набір плазмових білків, зокрема ендogenous фібриноген, інгібітори протеаз (α_2 -макроглобулін, тканинні інгібітори металопротеїназ) та коагуляційні кофактори. До ЗТП додавали ензим у концентраціях 0,01 та 0,02 мг/мл, інкубували протягом визначеного часу, після чого вносили індуктор агрегації та реєстрували процес агрегатометрично. Контролем слугувала ЗТП без додавання ензиму. Ступінь агрегації виражали у відсотках, тривалість реєстрації становила близько 7 хв.

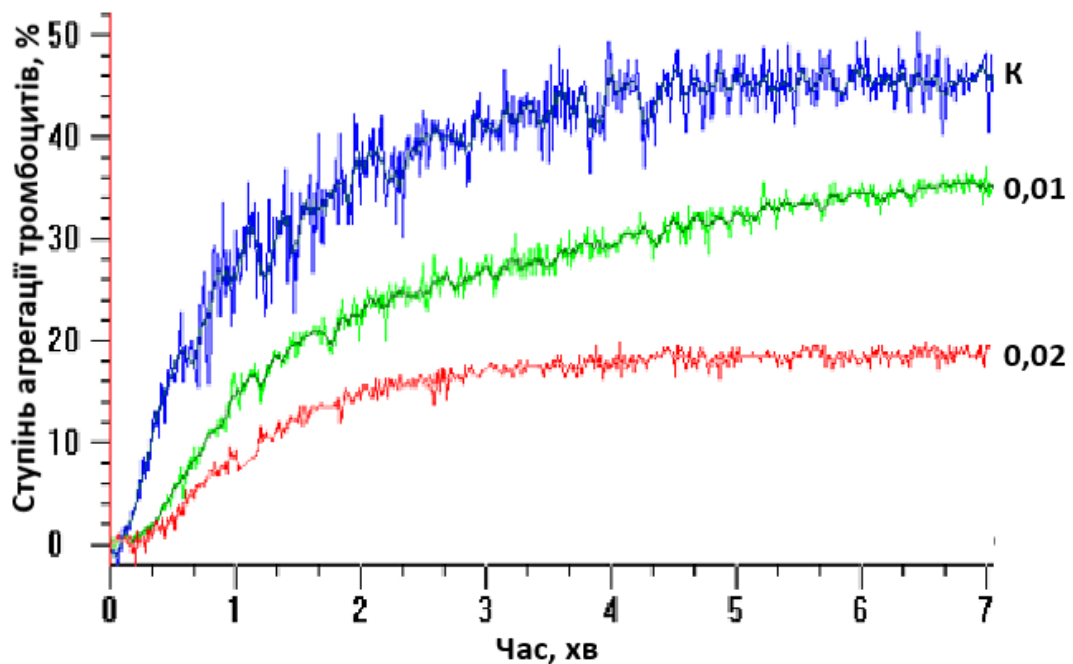


Рис. 3.8. Агрегатограми, що відображають дію протеїнази з отрути *Vipera berus berus* на АДФ-залежну агрегацію тромбоцитів у ЗТП. Криві агрегації: контроль без додавання ензиму (К); за наявності протеїнази у концентрації 0,01 мг/мл (0,01) та 0,02 мг/мл (0,02)

Аналіз агрегатограм показав, що у контрольній пробі сигнал швидко наростає протягом перших 1–2 хв і виходив на плато на рівні близько 45% – найвищого зареєстрованого ступеня агрегації. За концентрації ензиму 0,01 мг/мл крива наростала повільніше, а плато встановлювалося на рівні ~35%. Найвиразніше пригнічення спостерігали за 0,02 мг/мл: ступінь агрегації не перевищував 18%, тобто був більш ніж удвічі нижчим за контроль.

Повноцінна агрегація тромбоцитів вимагає інтактного фібриногену, який слугує макромолекулярним містком, зв'язуючись з активованими комплексами GPIIb/IIIa на сусідніх клітинах. Ця взаємодія залежить від послідовностей Arg-Gly-Asp (α 572–574) в межах α C-ділянки та NHLGGAQAGDV на C-кінці γ -ланцюга. За даними електрофорезу, ензим селективно руйнує A α -ланцюг разом із α C-доменом і RGD-сайтом, залишаючи γ -ланцюг інтактним. Отже, глибоке пригнічення агрегації за 0,02 мг/мл зумовлене насамперед втратою RGD-сайтів і додатково – конформаційними змінами молекули, які обмежують доступність γ -ланцюгового сайту.

Антиагрегантний ефект може зумовлюватися не лише виснаженням пулу нативного фібриногену, а й активним впливом продуктів його деградації. Низькомолекулярні фрагменти зберігають часткову спорідненість до рецепторів GPIIb/IIIa та діють як конкурентні інгібітори: займають активні центри інтегринів, але через малий розмір не здатні зшивати тромбоцити між собою. Такий подвійний механізм – деградація субстрату разом із конкурентним інгібуванням – і пояснює виражений ефект за вищої концентрації ензиму.

Описані ефекти отримано в ЗТП, яка містить численні інгібітори протеаз, зокрема α ₂-макрोगлобулін – основний фізіологічний інактиватор металопротеїназ. Збереження дозозалежного антиагрегантного ефекту за цих умов свідчить про здатність ензиму зберігати каталітичну активність у середовищі, наближеному до фізіологічного.

Одночасне порушення полімеризації фібрину та фібриноген-залежної агрегації тромбоцитів вказує на комплексний вплив протеїнази на систему гемостазу – як на первинну (тромбоцитарну), так і на вторинну (плазмову) ланки згортання крові.

ВИСНОВКИ

З отрути гадюки звичайної (*Vipera berus berus*) виділено й охарактеризовано металопротеїназу з молекулярною масою близько 55 кДа, яка вибірково розщеплює А α -ланцюг фібриногену, порушує тромбін-індуковану полімеризацію фібрину і пригнічує фібриноген-залежну агрегацію тромбоцитів. Одночасний вплив на плазмову та тромбоцитарну ланки гемостазу дозволяє розглядати ензим як потенційний прямий тромболітичний агент.

1. Аніонообмінною хроматографією на колонці Q-сефароза з отрути *Vipera berus berus* виділено високоочищену за даними електрофорезу протеїназу масою близько 55 кДа. Активність ензиму пригнічується за дії ЕДТА і не змінюється у присутності бензамідину, що властиво металопротеїназам класу Р-II.

2. Ензим переважно гідролізує А α -ланцюг фібриногену; В β -ланцюг розщеплюється значно повільніше, γ -ланцюг лишається інтактним протягом 90 хв. Утворення імунореактивних фрагментів масою 60, 48 і 40 кДа з N-кінцевим епітопом А α -ланцюга локалізує основний сайт розщеплення у C-кінцевому α C-домені.

3. Попередня інкубація фібриногену з ензимом дозозалежно змінює кінетику тромбін-індукованої полімеризації фібрину: лаг-фаза подовжується на 50–150 с, а максимальна оптична густина знижується з 0,075 до 0,042 од. за концентрації 0,02 мг/мл, що свідчить про формування пухкої сітки з тонших волокон унаслідок втрати α C-доменів.

4. Ензим дозозалежно пригнічує АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів – з 45% у контролі до 18% за концентрації 0,02 мг/мл. Ефект зберігається у присутності плазмових інгібіторів протеаз, зокрема α_2 -макрोगлобуліну, і зумовлений руйнуванням Arg-Gly-Asp-послідовності в межах α C-домену А α -ланцюга.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Singh, R., Gautam, P., Sharma, C. and Osmolovskiy, A. (2023). Fibrin and Fibrinolytic Enzyme Cascade in Thrombosis: Unravelling the Role. *Life (Basel)*, [online] Volume 13(11), p. 2196. Available at: <https://doi.org/10.3390/life13112196> [Accessed 11 Nov. 2023].
2. Altaf, F., Wu, S. and Kasim, V. (2021). Role of Fibrinolytic Enzymes in Anti-Thrombosis Therapy. *Frontiers in Molecular Biosciences*, [online] Volume 8, p. 680397. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.680397> [Accessed 28 May 2021].
3. Frangieh, J., Rima, M., Fajloun, Z., Henrion, D., Sabatier, J., Legros, C. and Mattei, C. (2021). Snake Venom Components: Tools and Cures to Target Cardiovascular Diseases. *Molecules*, [online] Volume 26(8), p. 2223. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules26082223> [Accessed 12 Apr. 2021].
4. Yu, X., Zhang, J., Zhang, Y., Wang, J., Zhao, Y., Wang, M., Guo, Y., Li, Y. and Huang, Y. (2025). Cellular and Molecular Mechanisms of Thrombosis and Thrombus-Targeted Thrombolytic Strategies. *Materials Today Bio*, [online] Volume 35, p. 102534. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2025.102534> [Accessed 7 Nov. 2025].
5. Sanchez, E., Flores-Ortiz, R., Alvarenga, V. and Eble, J. (2017). Direct Fibrinolytic Snake Venom Metalloproteinases Affecting Hemostasis: Structural, Biochemical Features and Therapeutic Potential. *Toxins (Basel)*, [online] Volume 9(12), p. 392. Available at: <https://doi.org/10.3390/toxins9120392> [Accessed 5 Dec. 2017].
6. Mackman, N., Bergmeier, W., Stouffer, G. and Weitz, J. (2020). Therapeutic strategies for thrombosis: new targets and approaches. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(5), pp. 333–352.
7. Flores Sanchez, E., Richardson, M., Gremski, L., Sanches Veiga, S., Yarleque, A., Niland, S., Martins Lima, A., Estevao-Costa, M. and Eble, J. (2016). A novel fibrinolytic metalloproteinase, barnettlysin-I from *Bothrops barnetti*

(Barnett's pitviper) snake venom with anti-platelet properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1860(3), pp. 542–556.

8. Avella, I., Wüster, W., Luiselli, L. and Martínez-Freiría, F. (2022). Toxic Habits: An Analysis of General Trends and Biases in Snake Venom Research. *Toxins (Basel)*, [online] Volume 14(12), p. 884. Available at: <https://doi.org/10.3390/toxins14120884> [Accessed 17 Dec. 2022].

9. Bordon, K., Cologna, C., Fornari-Baldo, E., Pinheiro-Júnior, E., Cerni, F., Amorim, F., Anjolette, F., Cordeiro, F., Wiezel, G., Cardoso, I., Ferreira, I., Oliveira, I., Boldrini-França, J., Pucca, M., Baldo, M. and Arantes, E. (2020). From Animal Poisons and Venoms to Medicines: Achievements, Challenges and Perspectives in Drug Discovery. *Frontiers in Pharmacology*, [online] Volume 11, p. 1132. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01132> [Accessed 24 Jul. 2020].

10. Bernardes, C., Santos-Filho, N., Costa, T., Gomes, M., Torres, F., Costa, J., Borges, M., Richardson, M., dos Santos, D., Pimenta, A., Homsibrandeburgo, M., Soares, A. and de Oliveira, F. (2008). Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*, 51(4), pp. 574–584.

11. Kini, R. and Koh, C. (2016). Metalloproteases Affecting Blood Coagulation, Fibrinolysis and Platelet Aggregation from Snake Venoms: Definition and Nomenclature of Interaction Sites. *Toxins (Basel)*, [online] Volume 8(10), p. 284. Available at: <https://doi.org/10.3390/toxins8100284> [Accessed 29 Sep. 2016].

12. Vidal, J., Schwartz, M., Garay, A., Valadares, N., Bueno, R., Monteiro, A., de Freitas, S. and Barbosa, J. (2024). Exploring the Diversity and Function of Serine Proteases in Toxicofera Reptile Venoms: A Comprehensive Overview. *Toxins (Basel)*, [online] Volume 16(10), p. 428. Available at: <https://doi.org/10.3390/toxins16100428> [Accessed 3 Oct. 2024].

13. Gardiner, E. and Andrews, R. (2008). The Cut of the Clot(h): Snake Venom Fibrinogenases as Therapeutic Agents. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 6(8), pp. 1360–1362.
14. Sanchez, E., Alvarenga, V., Oliveira, L., Oliveira, D., Estevao-Costa, M., Flores-Ortiz, R. and Eble, J. (2021). A Fibrinolytic Snake Venom Metalloproteinase, Mutalysin-II, with Antiplatelet Activity and Targeting Capability Toward Glycoprotein GPIb α and Glycoprotein GPVI. *Biochimie*, 184, pp. 1–7.
15. Hsu, C., Wu, W., Chang, Y., Kuo, H. and Huang, T. (2007). Antithrombotic Effect of a Protein-Type I Class Snake Venom Metalloproteinase, Kistomin, is Mediated by Affecting Glycoprotein Ib-von Willebrand Factor Interaction. *Molecular Pharmacology*, 72(4), pp. 984–992.
16. Halenova, T., Raksha, N., Kostiuk, O., Andriichuk, T., Ahafonova, L., Ahafonov, K., Piliponova, V., Maievskyi, O. and Savchuk, O. (2025). Coagulopathy in the Experimental Rats Elicited by *Vipera berus berus* or *Vipera berus nikolskii* Envenomation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 15(07), pp. 140–146.
17. Latinović, Z., Leonardi, A., Šribar, J., Sajevec, T., Žužek, M., Frangež, R., Halassy, B., Trampuš-Bakija, A., Pungerčar, J. and Križaj, I. (2016). Venomics of *Vipera berus berus* to Explain Differences in Pathology Elicited by *Vipera ammodytes ammodytes* Envenomation: Therapeutic Implications. *Journal of Proteomics*, 146, pp. 34–47.
18. Bocian, A., Urbanik, M., Hus, K., Łyskowski, A., Petrilla, V., Andrejčáková, Z., Petrillová, M. and Legath, J. (2016). Proteome and Peptidome of *Vipera berus berus* Venom. *Molecules*, [online] Volume 21(10), p. 1398. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules21101398> [Accessed 19 Oct. 2016].
19. Samel, M. and Siigur, J. (1990). Isolation and Characterization of Hemorrhagic Metalloproteinase from *Vipera berus berus* (Common Viper) Venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology and Toxicology*, 97(2), pp. 209–214.
20. Samel, M., Vija, H., Subbi, J. and Siigur, J. (2003). Metalloproteinase with Factor X Activating and Fibrinogenolytic Activities from *Vipera berus berus*

Venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 135(4), pp. 575–582.

21. Iskandarov, E., Gryshchuk, V., Platonov, O., Kucheriavyyi, Y., Slominskyi, O., Stohnii, Y., Vartanov, V. and Chernyshenko, V. (2022). Fractionation of *Vipera berus berus* Snake Venom and Detection of Bioactive Compounds Targeted to Blood Coagulation System. *Southeastern European Medical Journal*, 6(2), pp. 20–31.

22. Robertson, S. and Miller, M. (2018). Ambient Air Pollution and Thrombosis. *Particle and Fibre Toxicology*, [online] Volume 15(1), p. 1. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12989-017-0237-x> [Accessed 3 Jan. 2018].

23. Salavati, M., Arabshomali, A., Nouranian, S. and Shariat-Madar, Z. (2024). Overview of Venous Thromboembolism and Emerging Therapeutic Technologies Based on Nanocarriers-Mediated Drug Delivery Systems. *Molecules*, [online] Volume 29(20), p. 4883. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules29204883> [Accessed 15 Oct. 2024].

24. Kaiser, R., Gold, C. and Stark, K. (2025). Recent Advances in Immunothrombosis and Thromboinflammation. *Thrombosis and Haemostasis*, 125(12), pp. 1181–1194.

25. Ząbczyk, M., Natorka, J. and Undas, A. (2024). Novel Factors Affecting Fibrin Clot Formation and Their Clinical Implications. *Polish Archives of Internal Medicine*, [online] Volume 134(12), p. 16884. Available at: <https://doi.org/10.20452/pamw.16884> [Accessed 6 Nov. 2024].

26. Belcher, H., Litwa, K., Guthold, M. and Hudson, N. (2022). The Applicability of Current Turbidimetric Approaches for Analyzing Fibrin Fibers and Other Filamentous Networks. *Biomolecules*, [online] Volume 12(6), p. 807. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom12060807> [Accessed 9 Jun. 2022].

27. Leonardi, A., Sajevic, T., Latinović, Z., Pungerčar, J., Lang Balija, M., Trampuš Bakija, A., Vidmar, R., Halassy, B. and Križaj, I. (2015). Structural and Biochemical Characterisation of VaF1, a P-IIIa Fibrinogenolytic Metalloproteinase from *Vipera ammodytes ammodytes* Venom. *Biochimie*, 109, pp. 78–87.

28. Zeng, Z., Fagnon, M., Nallan Chakravarthula, T. and Alves, N. (2020). Fibrin Clot Formation under Diverse Clotting Conditions: Comparing Turbidimetry and Thromboelastography. *Thrombosis Research*, 187, pp. 48–55.
29. Preston, R., O'Sullivan, J. and O'Donnell, J. (2019). Advances in Understanding the Molecular Mechanisms of Venous Thrombosis. *British Journal of Haematology*, 186(1), pp. 13–23.
30. Markland, F. Jr. and Swenson, S. (2013). Snake Venom Metalloproteinases. *Toxicon*, 62, pp. 3–18.
31. Arimura, Y. and Funabiki, H. (2022). Structural Mechanics of the Alpha-2-Macroglobulin Transformation. *Journal of Molecular Biology*, [online] Volume 434(5), p. 167413. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167413> [Accessed 20 Dec. 2021].
32. Larsen, J. and Hvas, A. (2020). Fibrin Clot Formation and Lysis in Plasma. *Methods and Protocols*, [online] Volume 3(4), p. 67. Available at: <https://doi.org/10.3390/mps3040067> [Accessed 25 Sep. 2020].
33. Singh, S., Kumar, P., Padwad, Y., Jaffer, F. and Reed, G. (2024). Targeting Fibrinolytic Inhibition for Venous Thromboembolism Treatment: Overview of an Emerging Therapeutic Approach. *Circulation*, 150(11), pp. 884–898.
34. Bedrouni, W., Bedrouni, M. and Douketis, J. (2025). New Horizons in Venous Thromboembolism Management: A Narrative Review. *Journal of Clinical Medicine*, [online] Volume 14(21), p. 7668. Available at: <https://doi.org/10.3390/jcm14217668> [Accessed 29 Oct. 2025].
35. Becatti, M., Mckinnon, T., Fiorillo, C., Manfredi, A. and Emmi, G. (2024). Editorial: Molecular Mechanisms of Thrombosis. *Frontiers in Molecular Biosciences*, [online] Volume 11, p. 1497653. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2024.1497653> [Accessed 26 Sep. 2024].
36. Messadi, E. (2023). Snake Venom Components as Therapeutic Drugs in Ischemic Heart Disease. *Biomolecules*, [online] Volume 13(10), p. 1539. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom13101539> [Accessed 18 Oct. 2023].

37. Huang, S., Xin, H., Wang, X., Feng, G., Wu, F., Feng, Z., Xing, Z., Zhang, X., Xin, H. and Luo, W. (2023). Recent Advances on the Molecular Mechanism and Clinical Trials of Venous Thromboembolism. *Journal of Inflammation Research*, 16, pp. 6167–6178.
38. Stančiaková, L., Othman, M. and Kubisz, P. (2024). Management of Venous and Arterial Thrombosis. *Journal of Clinical Medicine*, [online] Volume 13(10), p. 2744. Available at: <https://doi.org/10.3390/jcm13102744> [Accessed 7 May 2024].
39. Crea, F. (2024). The Key Role of Thrombosis: Focus on Acute Coronary Syndrome, Venous Thrombo-Embolic, and Atrial Fibrillation. *European Heart Journal*, 45(1), pp. 1–4.
40. Leonardi, A., Sajevic, T., Pungercar, J. and Križaj, I. (2019). Comprehensive Study of the Proteome and Transcriptome of the Venom of the Most Venomous European Viper: Discovery of a New Subclass of Ancestral Snake Venom Metalloproteinase Precursor-Derived Proteins. *Journal of Proteome Research*, 18(5), pp. 2287–2309.
41. Op den Brouw, B., Ghezellou, P., Casewell, N., Ali, S., Fathinia, B., Fry, B., Bos, M. and Ikonopoulou, M. (2021). Pharmacological Characterisation of *Pseudocerastes* and *Eristicophis* Viper Venoms Reveal Anticancer (Melanoma) Properties and a Potentially Novel Mode of Fibrinogenolysis. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] Volume 22(13), p. 6896. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22136896> [Accessed 27 Jun. 2021].
42. Burchacka, E., Pięta, P. and Łupicka-Słowik, A. (2022). Recent Advances in Fungal Serine Protease Inhibitors. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, [online] Volume 146, p. 112523. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112523> [Accessed 10 Dec. 2021].
43. Shettar, S., Bagewadi, Z., Alasmay, M., Mannasaheb, B., Shaikh, I. and Khan, A. (2025). Comprehensive Biochemical, Molecular and Structural Characterization of Subtilisin with Fibrinolytic Potential in Bioprocessing.

Bioresources and Bioprocessing, [online] Volume 12(1), p. 21. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40643-025-00860-1> [Accessed 21 Mar. 2025].

44. Olaoba, O., dos Santos, P., Selistre-de-Araujo, H. and de Souza, D. (2020). Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs): A Structure-Function Update. *Toxicon X*, [online] Volume 7, p. 100052. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2020.100052> [Accessed 21 Jul. 2020].

45. Gutiérrez, J., Escalante, T., Rucavado, A. and Herrera, C. (2016). Hemorrhage Caused by Snake Venom Metalloproteinases: A Journey of Discovery and Understanding. *Toxins (Basel)*, [online] Volume 8(4), p. 93. Available at: <https://doi.org/10.3390/toxins8040093> [Accessed 26 Mar. 2016].

46. Romanazzi, M., Filardi, E., Pires, G., Cerveja, M., Melo-dos-Santos, G., Oliveira, I., Ferreira, I., Cerni, F., Santos-Filho, N., Monteiro, W., Almeida, J., Vaiyapuri, S. and Pucca, M. (2025). The Versatility of Serine Proteases from Brazilian *Bothrops* Venom: Their Roles in Snakebites and Drug Discovery. *Biomolecules*, [online] Volume 15(2), p. 154. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom15020154> [Accessed 21 Jan. 2025].

47. Latinović, Z., Leonardi, A., Koh, C., Kini, R., Trampuš Bakija, A., Pungerčar, J. and Križaj, I. (2020). The Procoagulant Snake Venom Serine Protease Potentially Having a Dual, Blood Coagulation Factor V and X-Activating Activity. *Toxins (Basel)*, [online] Volume 12(6), p. 358. Available at: <https://doi.org/10.3390/toxins12060358> [Accessed 29 May 2020].

48. Abd El-Aziz, T., Soares, A. and Stockand, J. (2019). Snake Venoms in Drug Discovery: Valuable Therapeutic Tools for Life Saving. *Toxins (Basel)*, [online] Volume 11(10), p. 564. Available at: <https://doi.org/10.3390/toxins11100564> [Accessed 25 Sep. 2019].

49. Ullah, A., Masood, R., Ali, I., Ullah, K., Ali, H., Akbar, H. and Betzel, C. (2018). Thrombin-Like Enzymes from Snake Venom: Structural Characterization and Mechanism of Action. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, pp. 788–811.

50. Chernyshenko, V., Platonova, T., Makogonenko, Y., Rebriev, A., Mikhalovska, L., Chernyshenko, T. and Komisarenko, S. (2014). Fibrin(ogen)olytic and Platelet Modulating Activity of a Novel Protease from the *Echis multisquamatis* Snake Venom. *Biochimie*, 105, pp. 76–83.
51. Kamiguti, A. (2005). Platelets as Targets of Snake Venom Metalloproteinases. *Toxicon*, 45(8), pp. 1041–1049.
52. Hsu, C., Wu, W. and Huang, T. (2008). A Snake Venom Metalloproteinase, Kistomin, Cleaves Platelet Glycoprotein VI and Impairs Platelet Functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 6(9), pp. 1578–1585.
53. Siigur, J. and Siigur, E. (2022). Biochemistry and Toxicology of Proteins and Peptides Purified from the Venom of *Vipera berus berus*. *Toxicon X*, [online] Volume 15, p. 100131. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2022.100131> [Accessed 12 Jun. 2022].
54. Leonardi, A., Gubensek, F. and Križaj, I. (2002). Purification and Characterisation of Two Hemorrhagic Metalloproteinases from the Venom of the Long-Nosed Viper, *Vipera ammodytes ammodytes*. *Toxicon*, 40(1), pp. 55–62.
55. Hagiwara, M. (2022). Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Western Blotting Analyses via Colored Stacking Gels. *Analytical Biochemistry*, [online] Volume 652, p. 114751. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114751> [Accessed 3 Jun. 2022].
56. Ostapchenko, L., Savchuk, O. and Burlova-Vasilieva, N. (2011). Enzyme Electrophoresis Method in Analysis of Active Components of Haemostasis System. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2(1), pp. 20–26.