

**АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ И БИОФИЗИКИ**

На правах рукописи
УДК 353. 547.577.591

НАСИРОВ Кабил Эркинович

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ НЕЙРО- И
ГЕМОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ КОМПОНЕНТОВ ЯДОВ
ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

03.00.13 - Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

ТАШКЕНТ - 2010

Работа выполнена в Институте физиологии и биофизики АН РУз

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор
Усманов Пулат Бекмуратович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Алламурадов Шухрат Иноятович

доктор биологических наук
Салихов Рустам Сабирович

доктор биологических наук
Тулаганов Рустам Турсунович

Ведущая организация: Национальный университет Узбекистана

Защита состоится «___» _____ 2010 г. в ___ часов на заседании специализированного совета Д 015.01.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук при Институте физиологии и биофизики АН РУз по адресу: 100095, Ташкент, ул. А.Ниязова, 1.

Тел./факс: (99871) 2469412. E-mail: pusman@uzsci.net.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии и биофизики АН РУз.

Автореферат разослан «___» _____ 2010 г.

**Ученый секретарь
специализированного совета
доктор биологических наук**

Ахмеджанов И.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность работы. На протяжении многих лет внимание исследователей привлекает исследование механизмов действия природных токсинов на мембранные и внутриклеточные процессы. Этот интерес связан с тем, что эти соединения в малых дозах могут вызвать биологические эффекты, идентичные механизмам, по которым в биологических системах постоянно протекают гомеостатические процессы. В основе механизмов действия природных соединений на клетки и внутриклеточные органеллы нервной и сердечно-сосудистой системы, как правило, лежит их способность инициировать сложные физиологические, биохимические и/или биофизические процессы, которые в конечном итоге изменяют и/или оптимизируют функциональную активность клетки-мишени.

В настоящее время, особое внимание уделяется исследованию механизма действия природных токсинов на функциональную активность ионных каналов и рецепторов. Ионные каналы и рецепторы играют ведущую роль в обеспечении и регуляции разнообразных клеточных процессов, а нарушения в их работе прямо связаны с патогенезом нервной и сердечно-сосудистой системы.

Сегодня не ставится под сомнение то, что основные заболевания сердечно-сосудистой системы, такие как атеросклероз, гипертоническая и ишемическая болезни, напрямую связаны с нарушением функциональной активности ионных каналов и рецепторов нервно-мышечных клеток кровеносных сосудов (Верещагин и др., 2002; Mathiesen et al., 2004; Суслина и др., 2005) и системы гемостаза (Громнацкий, 2002; Кудряшева и др., 2000).

Своеобразие системы свертывания крови выражается и в том, что ее патологические изменения возникают не только от нарушений функций отдельных ее компонентов, но и от нарушений функций элементов сосудистой стенки. Любые патологические изменения кровеносных сосудов могут, в той или иной степени, отразиться на процессе гемостаза.

Исследование молекулярных механизмов взаимодействия клеток сосудистой стенки и системы свертывания крови при норме и патологии позволяет выявить нарушение функционирования системы сосудистого и коагуляционного гемостаза.

Широкие возможности для исследования этих проблем представляют биологически активные соединения животного и растительного происхождения, обладающие уникальным свойством специфически воздействовать на клеточные процессы, управляемые ионными каналами, Ca^{2+} -транспортирующие системы и систему гемостаза (Cromer et al., 2008; Diochot et al., 2000; Huang et al., 2007; Swartz et al., 2007; Vetter et al., 2008). Установление специфичности этих соединений к клеткам-мишеням, позволит выяснить структуры механизма функционирования физиологически значимых мембранных образований, нервно-мышечных клеток кровеносных

сосудов и системы гемостаза. Безусловно, эти исследования крайне важны и могут найти применение не только при фундаментальных исследованиях, но могут стать основой для создания новых диагностических и лекарственных препаратов.

Степень изученности проблемы. В настоящее время известно довольно большое число природных токсинов, установлена их структура, охарактеризован механизм их действия. Благодаря пресинаптическим нейротоксинам ядов змей и латротоксину получены важные сведения о тонких механизмах синтеза, накопления и секреции медиаторов (Frontali et al., 1976; Graudins et al., 2002; Viljoen et al., 1982; Aird et al., 1989; Alexander et al., 1988). Нейротоксины (α -бунгаротоксин и α -кобротоксин) из ядов аспидовых змей, обладающие постсинаптическим действием, оказались уникальными аффинными лигандами, с помощью которых удалось выделить никотиновый холинорецептор и установить его химическую природу (Chang et al., 1963). С помощью аксональных нейротоксинов, таких как тетродотоксин, сакситоксин, батрахотоксин, вератридин, аконитин и полипептидные нейротоксины скорпионов, удалось представить функциональную организацию натриевого канала (Narahashi, 1974; Ritchie, 1976). В целом, с помощью нейротоксинов получена ценная информация об организации и принципах функционирования некоторых ионных каналов и нейрорецепторов.

Однако, несмотря на достигнутые успехи, остаются нерешенными ряд вопросов, связанных с механизмами функционирования отдельных структур ионных каналов и нейрорецепторов. Поиск новых специфических токсинов, регулирующих функциональную активность ионных каналов и рецепторов, позволит выяснить механизмы мембранных образований нервных и мышечных клеток.

Учитывая способность ферментов (протеаз, гиалуронидаз и фосфолипаз) ядов змей влиять на факторы свертываемости крови, разрушать структуру внеклеточных и клеточных мембран кровяных клеток, принято рассматривать их в качестве гемотоксинов (Barbaro et al., 2005; Young et al., 2001; Ushkaryov et al., 2004; Schanbacher et al., 1973; Nagaraju et al., 2006). Многие гемотоксины являются уникальными ферментами, воздействующими на отдельные звенья системы гемостаза. Тромбиноподобные сериновые протеазы и металлопротеазы ядов могут вызывать нарушения свертываемости крови и фибринолиза, приводя к тромбоэмболиям или геморрагиям (Hamza et al., 2010).

Существенную проблему для диагностики нарушения свертываемости крови создают тромбгеморрагические варианты патологии, при которых показатели гемостазиологического каскада могут быть разнонаправленными и нередко не соответствующими клиническим проявлениям.

Фундаментальные исследования тромбгеморрагических действий тромбиноподобных протеаз ядов змей, позволят определить новые, ранее

неизвестные механизмы нарушений данного процесса и обоснованно разработать рекомендации по возможному использованию в клинко-диагностической оценке степени тромбогенной опасности [Egeberg O., 1999; Neerman-Arbez M., 2001] и геморрагических осложнений при заболеваниях сердечно-сосудистой системы.

Связь диссертационной работы с тематическими планами НИР. Работа выполнялась в соответствии с темами НИР лабораторий биофизики клетки и электрофизиологии Института физиологии и биофизики АН РУз по проекту фундаментальных исследований: Ф-4.1.1. «Исследование механизмов фармакологической регуляции кальциевых каналов нервных и мышечных клеток» (2004-2007 гг.), проекту Фонда поддержки фундаментальных исследований АН РУз: №112-04. «Исследование механизмов регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток кровеносных сосудов» (2004-2005 гг.), проектам ГНТП АН РУз №104. «Выделение и исследование биологически активных соединений из природных ядов с целью создания новых лекарственных средств и диагностических препаратов» (1994-1996 гг.) и А-10-011. «Создание метода ранней диагностики сердечно-сосудистых заболеваний на основе компонентов змеиных ядов» (2006-2008 гг.), а также по проектам фонда поддержки ГКНТ РУз: «Исследование механизмов регуляции функционального состояния тромбоцитов» (1998-99 гг.) и «Исследование механизма действия компонентов ядов змей на тромбоцитарный и антикоагуляционный потенциал системы гемостаза» (2002-2003 гг.).

Цель исследования. Цель данной работы - поиск новых специфических биологически активных соединений из ядов животного происхождения, регулирующих функциональную активность ионных каналов и рецепторов, а также нервных и мышечных клеток и систему гемостаза.

Задачи исследования. Для выполнения этой цели поставлены следующие задачи:

- выделить и изучить токсикологическую и физико-химическую характеристику компонентов ядов пауков *Argiope lobata*, *Anemesia sp.*, *Eresus niger*, *Allohona singorensis*, *Agelena labirintica*, скорпионов *Mesobuthus caucasicus*, *Mesobuthus sp.*, змей гюрзы *Vipera lebetina*, эфы *Echis multisquamatus*;
- исследовать механизм действия компонентов яда паука *Argiope lobata* на участок глутаматного рецептора, управляющий ионным каналом и его десенситизацией;
- изучить действие фракций яда пауков *Anemesia sp.*, *Eresus niger* на механизмы секреции медиатора пресинаптических мембран нервных клеток;
- изучить действие фракций яда пауков *A. singorensis* и *A. labirintica*, специфически модифицирующих Ca^{2+} -каналы и рецепторы нервно-мышечных клеток;

- изучить избирательное действие инсектотоксинов скорпионов *Mesobuthus caucasicus* и *Mesobuthus sp.* на насекомых разных систематических групп;

- изучить действие ядов змей гюрзы *Vipera lebetina* и эфы *Echis multisquamatus* и их компонентов на отдельные звенья системы гемостаза (коагуляционное и тромбоцитарное) в норме и патологии.

Объект и предмет исследования. При выполнении настоящей работы исследовались механизмы токсического действия ядов пауков *Argiope lobata* *Anemesia sp.*, *Eresus niger*, *A. singorensis*, *A. labirintica*, скорпионов *Mesobuthus caucasicus*, *Mesobuthus sp.*, змей: гюрзы *Vipera lebetina*, эфы *Echis multisquamatus* и их компонентов на ионные каналы и рецепторы нервных и мышечных клеток и систему гемостаза.

Методы исследований. В работе использованы общепринятые электрофизиологические, хроматографические методы исследования, радиолигандный и флуоресцентный анализы, а также проведен гемокоагуляционный тест. Используются компьютерные программы Origin 6.1 и Excel (Microsoft, США).

Гипотеза исследования. Установление строгой специфичности этих токсических соединений к клетке-мишени позволит выяснить механизм их действия и существенно расширит представления о механизмах функционирования и организации ионных каналов и рецепторов, а также об особенностях организации модуляции кальциевого гомеостаза и связанных с ним транспортных систем различных клеток сердечно-сосудистой системы и гемостаза.

Основные положения, выносимые на защиту.

На защиту выносятся результаты собственных исследований механизмов нейро- и гемотоксического действия компонентов ядов некоторых пауков, скорпионов и змей на:

- функциональное состояние различных участков NMDA-рецептора, управляющего ионным каналом и его десенситизацией;

- Ca^{2+} -зависимые процессы - секрети медиаторов нервных окончаний;
- клеточные процессы, управляемые ионными каналами и рецепторами;
- факторы свертывания крови и системы гемостаза.

Научная новизна. В процессе исследования особенностей механизмов нейро- и гемотоксического действия различных компонентов ядов некоторых пауков, скорпионов и змей впервые показаны:

- методами связывания показано, что компоненты яда паука *Argiope lobata* способны специфически взаимодействовать с разными участками глутаматного рецептора. Токсин A-V-2-1 (м.м. 637 Да) конкурентно взаимодействует с глутаматными участками NMDA-рецепторов. Другой токсин - «аргиолобатин» (м.м. 657 Да) в разных концентрациях проявляет двухфазный характер действия на связывание [^3H]-МК-801 и [^3H]-нитрендипина с фракцией синаптических мембран. Это обусловлено

взаимодействием токсина как минимум с двумя субрецепторными участками глутамата, в свою очередь увеличивающих и ингибирующих сродство рецептора к глутамату. В этом случае токсин осуществляет регуляцию Ca^{2+} -канала L-типа и NMDA-рецептора;

- выделены нейротоксические компоненты из яда паука *Anemesia sp.* An4 (м.м. ~10 кДа) и An5 (м.м. ~5 кДа), избирательно взаимодействующие с функционально различными участками нервно-мышечных синапсов саранчи. Установлена взаимосвязь между механизмом действия этих компонентов и их токсичностью;

- впервые показано, что нейротоксический компонент Ag1 1 (м.м. 1000 Да), выделенный из яда паука *A.labirintica*, блокирующий Ca^{2+} -каналы пресинаптической мембраны нервно-мышечных синапсов лягушки, не проявляет токсичность на мышцах (до 100 мг/кг веса) при внутрибрюшинном и внутривенном введении, тогда как при интродеребровентрикулярном введении токсичность была равна $1,5 \pm 0,25$ мкг/мкл;

- из яда паука *A.singoriensis* выделен нейротоксический компонент As-1₃, (м.м. ~11000 Да), взаимодействующий как с потенциал-, так и рецептор-зависимыми Ca^{2+} -каналами;

- из яда скорпионов *Mesobuthus caucasicus* и *Mesobuthus sp.* выделены токсины - McITX1 ~3 кДа, McITX3 ~3 кДа, McITX2 ~7 кДа и Msp₍₅₋₈₎-VI-13 ~3 кДа, Msp₍₅₋₈₎-XVII-4 ~3 кДа, Msp₍₅₋₈₎-XII-5 ~3 кДа с высокой избирательностью для насекомых разных систематических групп.

- показано, что фракция Ем-3-V, выделенная из яда змей эфы *Echis multisquamatus*, в отличие от ядов других змей вызывает свертывание цитратной плазмы и усиление агрегации тромбоцитов в отсутствие ионов кальция в среде;

- впервые показано, что в основе действия лебетазы (м.м. ~29 кДа), выделенной из яда змей гюрзы *Vipera lebetina*, лежит её взаимодействие, как с внеклеточным кальцием, так и тканевым фактором 3 свертывания крови.

Научная и практическая значимость результатов исследования.

Эти данные представляют, прежде всего, фундаментальный интерес, поскольку, использование компонентов ядов животных в качестве инструментов исследования, позволяют существенно расширить представления о механизмах функционирования и организации глутаматных рецепторов, сократительной активности ГМК, активации гемостаза, а также об особенностях организации модуляции кальциевого гомеостаза и связанных с ним транспортных систем различных клеток.

Полученные результаты могут найти применение при установлении нарушений молекулярных механизмов функционирования сердечно-сосудистой и системы гемостаза, а также могут стать основой для создания новых (диагностических) и лекарственных препаратов на основе компонентов исследованных ядов животных.

Реализация результатов. На основе полученных результатов разработана технология производства противовоспалительного и болеутоляющего лекарственного препарата «Випротон», которая запатентована Патентным ведомством Республики Узбекистан (Патенты № 3333 и № 3337) и его применение одобрено Фармакопейным Комитетом Министерства здравоохранения Республики Узбекистан (Сертификат № 003-01 МЗ РУз от 08.05.2001 г.) на использование мази в медицинской практике. Оформлена «Фармакопейная статья» 42Уз-0402-2006 от 17.08.2006 г. Разработана инструкция по применению мази «Випротон» от 15 апреля 2002 г., утвержденная Фармакопейным комитетом МЗ РУз.

На основе компонента яда гюрзы *Vipera lebetina* создан диагностический метод, позволяющий определить активацию внешнего пути свертывания крови, который проявляется при нарушении функции сосудистого гемостаза.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на XV Всесоюзном физиологическом обществе им. И.П.Павлова (Кишинев, 1987); на Всесоюзном симпозиуме «Ионные каналы в биологических мембранах» (Пушино, 1989); на Международном симпозиуме «Химия природных соединений» (Ташкент, 1994); на Международной Пущинской конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2004, 2005, 2008, 2010); на Всероссийских конференциях с международным участием (Санкт-Петербург, 2003, 2005, 2010); на XIX съезде физиологического общества им. И.П.Павлова (Екатеринбург, 2004); на II Всероссийской конференции по клинической гемостазиологии и гемореологии в сердечно-сосудистой хирургии (Москва, 2005); Pan-American Section Congress of the IST (Querétaro, México, 2007), на научном семинаре при Институте Физиологии и биофизики АН РУз (Ташкент, 2010).

Опубликованность результатов. По теме диссертации опубликовано 50 научных работ, в том числе 20 статей, 2 патента, 28 тезисов докладов на Международных и Республиканских научных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы (345 ссылок). Работа изложена на 250 страницах компьютерного текста, включает 74 рисунка и 11 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении диссертации обоснована актуальность работы, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, научная и практическая значимость, сформулированы положения, выносимые на защиту, обосновано практическое внедрение полученных результатов исследования.

В первой главе приведен анализ литературных источников о действии природных ядов на биологические системы, потенциал- и рецептор-управляемые ионные каналы, активацию каскада свертывания плазмы крови.

Вторая глава посвящена описанию материалов и методов исследования.

При выполнении настоящей работы использовались яды пауков *Argiope lobata*, *Anemesia sp.*, *Eresus niger*, *A.singorensis*, *A.labirintica*; скорпионов *Mesobuthus caucasicus*, *Mesobuthus sp.*; змей: гюрзы *Vipera lebetina*, эфы *Echis multisquamatus*, закупленных в Ташкентском зоокомбинате.

Для экспериментальных исследований использовали беспородных лабораторных крыс и мышей. Все исследования на животных проводились с соблюдением норм биомедицинской этики.

Параметры токсичности оценивали методом пробит-анализа (Беленький, 1959; Finney, 1980).

Разделение и очистка компонентов ядов различных животных осуществлялись методом колоночной хроматографии. Спектрофотометрический контроль разделения проводили на приборе Uvicord S (LKB, Швеция). Очистка фракций методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) проводилась совместно с сотрудниками Института биоорганической химии АН РУз Плужниковым К.А. и Зиявуддиновым Д.

Для определения молекулярных масс фракций использовали колоночную хроматографию и электрофорез в 15% ПААГ с SDS. В качестве белков-маркеров использовали белковые стандарты (Sigma, США).

Радиолигандные анализы проводились совместно с сотрудником кафедры биофизики биолого-почвенного факультета НУУз к.б.н. Тонких А.К. Эксперименты по связыванию проводили с помощью радиолигандов: [³H]-глутамата, [³H]-МК-801 и [³H]-каината на синаптических мембранах, выделенных из мозга крыс, синаптические мембраны были получены методом дифференциального центрифугирования, как описано в работе (Hajos et al., 1975). Изменение радиоактивности препаратов измеряли на счетчике «Бета-2».

Исследование внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} в тромбоцитах крысы проводили совместно с м.н.с. Черновой Л.А. с помощью флуоресцентных зондов Fura-2АМ и хлортетрациклина (ХТЦ) при длинах волны возбуждения 396 нм; 405 нм, регистрации флуоресценции - 500 нм; 530 нм, соответственно. Изменение флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре (Hitachi, Япония).

Определение ферментативных активностей осуществляли по методу: Алексеенко и др., 1968 (протеолитическая), de Haas et al., 1982 (фосфолипазная) и Bessey et al., 1946 (фосфодиэстеразная)

Коагуляционные тесты проводили совместно с профессором лаборатории фармакологии и гемостазиологии университета Фридриха Шиллера Новаком Г. (г.Йена, Германия).

Действие ядов и их компонентов на свертываемость крови оценивалось по их влиянию на известные тесты гемостаза (АЧТВ, РФМК, техпластин-тест и др.) на коагулографе и тромбоэластографе (ГКГМ-1-2). Все исследования проводились в опытах *in vitro* на крови и плазме, заготовленной от доноров на цитрате натрия 3,8% в соотношении 1:9 и плазме крови больных сердечно-сосудистыми заболеваниями, полученные из клиники Ташкентской медицинской академии.

Агрегация тромбоцитов регистрировалась по методу Борна (Born et al., 1962) на спектрофотометре Varian-634. В качестве индукторов агрегации тромбоцитов использовали АДФ (2 мкМ), адреналин (5 мкМ), тромбин (0,5 ед/мл) и ристомин (5 мкМ) (Sigma). Моделирование острого внутримозгового кровоизлияния и ишемии головного мозга проводились совместно с доцентом кафедры неврологии Ташкентской медицинской академии, д.м.н. Саидвалиевым Ф. по модифицированной методике (Del Bigio et al., 1996) и (Герштейн с соавт., 1996; Yokoyma et al., 1999), соответственно.

Действие фракции яда гюрзы на сократительную активность аорты в норме и патологии было исследовано совместно с к.б.н. Есимбетовым А.Т. по методу Блаттнер и др. (1983) на установке, аналогичной той, что описана в работе Vandier et al. (2002).

Эксперименты на нервно-мышечных препаратах были проведены совместно с д.б.н. Каликуловым Д. на изолированных нервно-мышечных препаратах портняжной мышцы лягушки *Rana temporaria*. Регистрацию мембранного и синаптических потенциалов осуществляли стандартной микроэлектродной техникой.

Статистическая обработка данных и оформление иллюстраций проводилась с помощью компьютерной программы Origin 6.1 и Excel (Microsoft, США). Статистическую значимость различий между контрольными и опытными значениями определяли, используя для ряда данных парный t-тест, где контрольные и опытные значения взяты вместе, и непарный t-тест, если они взяты раздельно. Значения $P < 0,05$ и $P < 0,01$ указывают на статистически значимые различия.

В третьей главе изложены результаты исследований особенностей механизмов нейро- и гемотоксического действия различных ядов пауков, и их компонентов на Ca^{2+} -зависимые процессы, управляемые ионными каналами и нейрорецепторами клеток нервной и сердечно-сосудистой системы и гемостаза.

В первой части данной главы приведены полученные с помощью радиолигандов: [^3H]-глутамата, [^3H]-МК-801 и [^3H]-каината результаты а) исследований кинетических свойств глутаматных рецепторов, полученных из синаптических мембран гиппокампа крыс, и б) поиска новых блокаторов и модуляторов глутаматных рецепторов из яда животных.

Исследование по определению констант связывания [^3H]-глутамата с синаптическими мембранами проводились на основе кривых зависимости количества связавшегося [^3H]-глутамата от его концентрации в растворе. Для осуществления специфической абсорбции на синаптических мембранах были выбраны концентрации [^3H]-глутамата от 0,1 до 100 мкМ. Показано, что зависимость специфического связывания [^3H]-глутамата от его концентрации носила насыщающий характер. Величина неспецифической абсорбции [^3H]-глутамата, обусловленной присутствием молекул в инкубационной среде 0,5 мкМ [^3H]-глутамата (концентрации, близкой к константе диссоциации), составляла около 35% от общего связывания. Представление экспериментальных данных в координатах Скэтчарда свидетельствовало о наличии однородной популяции участков связывания [^3H]-глутамата с $K_d=0,51\pm0,05$ и $V_{\text{макс}}=3,50\pm0,09$ пмоль/мг белка. Однако, анализ кинетики связывания [^3H]-глутамата в координатах Хилла свидетельствует о сложном характере рецепторного взаимодействия. Индекс Хилла, численно равный tg составлял $0,65\pm0,04$ ($nH<1$), что указывает на наличие отрицательной кооперативности во взаимодействии глутамат-связывающих участков. Явление кооперативности, само по себе, позволяет утверждать о наличии на одном рецепторе нескольких, аллостерически взаимодействующих медиатор-связывающих участков.

Об однородности глутаматных NMDA-рецепторов свидетельствует также прямолинейность зависимости степени насыщения рецепторов от концентрации специфического антагониста NMDA-рецепторов [^3H]-МК-801 в координатах Скэтчарда. Этот анализ установил, что константа диссоциации для связывания [^3H]-МК-801 с синаптическими мембранами составляла $5,93\pm0,61$ нМ, а ёмкость насыщения связывающих мест - $751,01\pm39,22$ пмоль/мг белка. Индекс Хилла (nH) был равен $\text{tg}=0,98\pm0,07$, что свидетельствует об отсутствии кооперативности во взаимодействии NMDA-рецепторов с [^3H]-МК-801.

Несмотря на то, что анализ кинетики связывания [^3H]-глутамата не выявил наличия во фракции синаптических мембран нескольких популяций глутаматных рецепторов, помимо NMDA-рецепторов в гиппокампе, по всей видимости, присутствуют глутаматные рецепторы каинатного типа, что подтверждается специфическим связыванием [^3H]-каината. Данное связывание имело оптимальные значения при концентрациях меченого агониста в инкубационной среде от 1 до 50 нМ. Этот факт позволяет утверждать, что глутаматные рецепторы NMDA-типа и каинатного типа не проявляют большого различия в средстве к медиатору.

Ранее из яда паука *Argiope lobata* был выделен ряд низкомолекулярных компонентов (м.м. 622-674 Да), специфически взаимодействующих с глутаматными рецепторами нервно-мышечных синапсов саранчи (Насиров, 1991).

При исследовании токсикологической активности низкомолекулярных компонентов показано, что эти токсины при высоких концентрациях (ЛД₅₀ 180-200 мг/кг массы) у мышей при внутрибрюшинном и внутривенном введении вызывают состояние возбуждения, потерю координации движений, парезы конечностей. Анализ клинической картины свидетельствовал о преимущественно нейротоксическом поражении животных. Однако, при введении этих токсинов непосредственно внутрь черепа мышей (лобный гребень - субдуральное пространство мозга), токсичность резко возрастала. При этом токсичность (ЛД₅₀) компонентов А-V-2-1 и аргиолобатина (А-V-7-7) была равна 10 мкг/мкл и 0,5-1 мкг/мкл, соответственно.

Каликуловым Д. показано, что компоненты А-V-2-1 и аргиолобатин, являясь наиболее активными, подавляют токи, индуцируемые глутаматом, действуя на уровне рецептор-канального комплекса глутаматного рецептора, аргиолобатин неконкурентно действует на уровне ионного канала глутаматного рецептора нейронов ППа4 и ППа1 виноградной улитки, а другой компонент А-V-2-1 конкурентно взаимодействует непосредственно с узнающим участком глутаматных рецепторов нейронов ППа4 и ППа1 виноградной улитки.

На нервно-мышечных синапсах саранчи аргиолобатин подавляет синаптические и глутамат-активируемые токи, сокращает время их полуспада и усиливает десенситизацию глутаматных рецепторов (Каликулов, 1995).

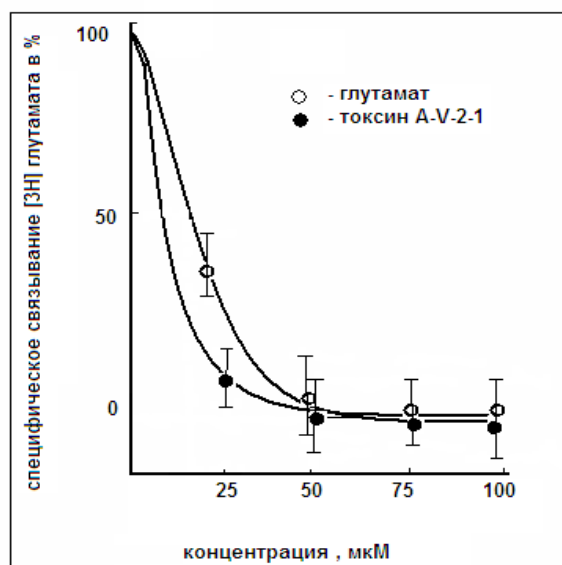
В связи с этим был исследован механизм действия компонентов А-V-2-1 и аргиолобатина на участок глутаматного рецептора, управляющего ионным каналом и его десенситизацией.

В экспериментах по связыванию L-[³H]-глутамата с синаптическими мембранами из мышц краба было установлено, что компонент А-V-2-1 конкурентно ингибирует связывание немеченого глутамата, а аргиолобатин увеличивает связывание L-[³H]-глутамата с синаптическими мембранами подобно агентам, углубляющим десенситизацию глутаматных рецепторов (Насиров, 1991).

В другом эксперименте по связыванию L-[³H]-глутамата с синаптическими мембранами, выделенными из мозга крысы, модулирующее действие токсинов А-V-2-1 и аргиолобатина оценивалось двумя способами: на основе кривых зависимости количества связавшегося [³H]-глутамата от концентрации немеченого глутамата и изучения кинетики связывания [³H]-глутамата в присутствии токсина.

Было показано, что токсин А-V-2-1 эффективно подавляет специфическое связывание [³H]-глутамата. Связывание 1 мкМ [³H]-глутамата, наблюдаемое при отсутствии токсина в инкубационной среде, соответствует 100%. Неспецифическое связывание - около 40% от общего связывания [³H]-глутамата. Максимальное ингибирующее действие

наблюдалось в пределах концентраций токсина от 10 до 100 мкМ. Максимальный ингибирующий эффект достигал 100%, что является признаком наличия конкуренции между токсином А-V-2-1 и [^3H]-глутаматом (рис.1). Представление данных в обратных координатах Лайньюивера-Берка выявило, что присутствие в инкубационной среде 5 мкМ токсина А-V-2-1 приводит к увеличению константы диссоциации (от $0,53 \pm 0,02$ мкМ в контроле, до $1,68 \pm 0,03$ мкМ в присутствии токсина). При этом величина ёмкости насыщения глутамат-связывающих участков в мембранном препарате ($B_{\text{макс}}$) практически не изменялась и составляла $1,70 \pm 0,03$ пМ/мг белка в контроле и $1,69 \pm 0,03$ пМ/мг белка в присутствии токсина.



Связывание 1 мкМ [^3H]-глутамата соответствует 100%. Неспецифическое связывание - 40% от общего связывания [^3H]-глутамата $P < 0,05 (n=6)$.

Рис.1. Связывание [^3H]-глутамата с фракцией синаптических мембран из мозга крыс в присутствии различных концентраций немеченого глутамата и токсина А-V-2-1.

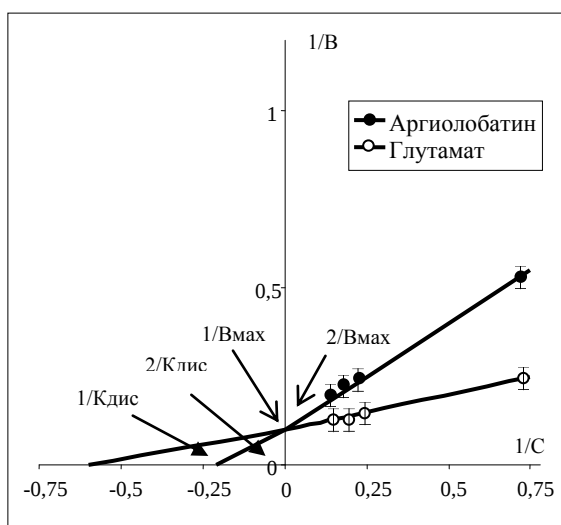
Полученные результаты свидетельствуют о том, что токсин А-V-2-1 непосредственно взаимодействует с глутамат-связывающими участками глутаматного рецептора.

Эти результаты подтверждают данные, полученные в электрофизиологических исследованиях. Отсутствие влияния токсина А-V-2-1 на потенциал реверсии глутамат-активируемых токов, параллельное смещение кривой дозы-эффект и восстановление максимумов токов при увеличении концентрации апплицируемого глутамата указывают на то, что токсин А-V-2-1 взаимодействует непосредственно с узнающим участком глутаматного рецептора исследуемых нейронов виноградной улитки (Каликулов, 1995).

Токсин А-V-2-1 в микромолярных (0,1-50 мкМ) концентрациях проявляет конкурентное ингибирующее действие на связывание [^3H]-МК-801 с фракцией синаптических мембран. При этом А-V-2-1 полностью снимает стимулирующий эффект глутамата. Этот эффект токсина А-V-2-1 может объясняться тем, что наряду со свойствами антагониста ему присущи свойства агониста. Такое двойственное действие ряда агонистов хорошо

объясняется теорией взаимодействия веществ с рецептором (Paton, 1961). Согласно этой теории, способность вещества одновременно проявлять ингибирующее или активирующее действие определяется константой скорости распада комплекса лиганд-рецептор (k). При высоких значениях k вещество является агонистом, при средних k обладает смешанным действием, а при низких k антагонистом. Из этого можно сделать вывод, что токсин А-V-2-1 обладает свойством антагониста смешанного типа, которое проявляется в конкуренции между токсином А-V-2-1 и глутаматом за узнающий сайт глутамата (рис. 4).

В отличие от токсина А-V-2-1, аргиолобатин в разных концентрациях имел более сложный, двухфазный характер действия. В концентрациях от 0,01 до 10 мкМ данный токсин увеличивал связывание [^3H]-глутамата с синаптическими мембранами. Величина полумаксимального потенцирующего эффекта токсина EC_{50} была равна $0,16 \pm 0,03$ мкМ. Связывание 1 мкМ [^3H]-глутамата, наблюдаемое при отсутствии токсина в инкубационной среде, соответствует 100%. Максимальное увеличение связывания [^3H]-глутамата (на 50-60% от контрольной величины) наблюдалось в присутствии 10 мкМ аргиолобатина. Анализ экспериментальных данных по влиянию аргиолобатина (1 мкМ) на кинетику связывания [^3H]-глутамата, представленных в обратных координатах Лайньюивера-Берка (рис. 2) позволил определить механизм потенцирующего действия токсина. Более высокие (≤ 10 мкМ) концентрации аргиолобатина приводили к уменьшению величины K_d до $0,37 \pm 0,04$ мкМ и фактически не изменяли значение $V_{\text{макс}}$ $5,1 \pm 0,09$ пмоль/мг белка. Таким образом, становится ясно, что потенцирование связывания [^3H]-глутамата, обусловлено увеличением аффинитета (сродства) рецепторов к глутамату, но не изменением количества связывающих участков. Концентрации аргиолобатина, превышающие 10 мкМ, приводили к уменьшению связывания [^3H]-глутамата с синаптическими мембранами.



Связывание 1 мкМ [^3H]-глутамата при отсутствии токсина в инкубационной среде соответствует 100%. Максимальное связывание ($V_{\text{макс}}$) [^3H]-глутамата в присутствии 10 мкМ аргиолобатина $P < 0,05$ ($n=6-8$).

Рис.2. Связывание [^3H]-глутамата с синаптическими мембранами из мозга крыс в присутствии разных концентраций аргиолобатина, в обратных координатах Лайньюивера-Берка.

Подобная двухфазность действия исследуемого токсина, согласно основам классической оккупационной теории, обусловлена наличием как минимум двух рецепторных участков, взаимодействующих с аргилолобатином: высокоаффинный участок, оккупация которого приводит к увеличению сродства рецептора к глутамату; и низкоаффинный, оккупация которого уменьшает данное сродство.

Вместе с тем показано, что аргилолобатин также ингибирует связывание [^3H]-каината, агониста глутаматных рецепторов, возбуждающее или активирующее действие которого, в отличие от глутамата, не сопровождается десенситизацией глутаматного рецептора. Считают, что каинат взаимодействует как с узнающим участком, так и с «центром десенситизации глутаматного рецептора» (Daoud, Usherwood, 1975). В связи с тем, что агенты, углубляющие десенситизацию глутаматного рецептора, одновременно усиливают его сродство к медиатору, вызываемое аргилолобатином увеличение связывания меченого глутамата объяснялось его влиянием на так называемый участок десенситизации рецептора.

Аргилолобатин также обладал как потенцирующим, так и ингибирующим действием на связывание [^3H]-МК-801 с синаптическими мембранами. При этом оптимальный потенцирующий эффект наблюдался в пределах концентрации токсина от 1 до 10 мкМ ($\text{EC}_{50}=5,5$ мкМ). В концентрациях, превышающих 10 мкМ, данный токсин ингибировал связывание [^3H]-МК-801 ($\text{IC}_{50}=27,46\pm 1,92$ мкМ). Ингибирование достигало максимального значения (70% от контроля) в присутствии в инкубационной среде 50 мкМ аргилолобатина. Более высокие концентрации токсина не приводили к дальнейшему подавлению связывания, что указывает на отсутствие конкуренции между аргилолобатином и [^3H]-МК-801.

С целью идентификации участков NMDA-рецептора, взаимодействующих с аргилолобатином было изучено действие некоторых известных лигандов NMDA-рецепторов на связывание [^3H]-МК-801 в присутствии аргилолобатина.

При этом установлено, что в присутствии в инкубационной ячейке насыщающей концентрации глутамата (100 мкМ), аргилолобатин сохранял двойственное действие на связывание [^3H]-МК-801 ($\text{EC}_{50}=0,13\pm 0,02$ мкМ, $\text{IC}_{50}=32,88\pm 1,92$ мкМ). Это говорит о том, что увеличение связывания [^3H]-МК-801 не обусловлено взаимодействием аргилолобатина с уже оккупированными глутаматом медиатор-связывающими участками.

Другая аминокислота - глицин, благодаря связыванию с глициновыми сайтами NMDA-рецепторов, обеспечивает оптимальное функционирование этого рецепторно-ионофорного комплекса, предупреждая его гиперактивацию, и тем самым, ограничивая глутаматную эксайтотоксичность и, возможно, усиливая действие ионов магния.

В наших экспериментах показано, что глицин увеличивал связывание [^3H]-МК-801 с синаптическими мембранами примерно на 60% от контроля.

Величина полумаксимального стимулирующего эффекта глицина (EC_{50}) составляла $18,35 \pm 3,14$ мкМ. Вместе с тем, стимулирующее действие аргинолобатина на связывание [3H]-МК-801 сохранялось и в присутствии насыщающей концентрации глицина (100 мкМ), что свидетельствует о непричастности глицин-связывающего участка к токсин-вызванному увеличению связывания [3H]-МК-801. Действие аргинолобатина в присутствии глицина характеризовалось следующими количественными параметрами: $EC_{50} = 0,08 \pm 0,01$ мкМ; $IC_{50} = 7,52 \pm 0,95$ мкМ.

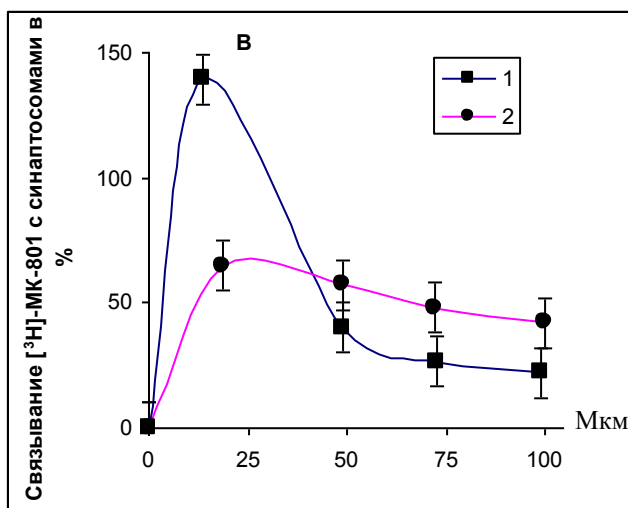
Как показали эксперименты, в концентрациях от 0,05 до 1 мМ ионы магния, как и в случае с [3H]-глутаматом, обладают слабым потенцирующим действием (около 35% от контроля) на связывание [3H]-МК-801. Более высокие концентрации Mg^{2+} (>1 мМ) ингибировали связывание. Максимальный ингибирующий эффект составлял 60% от контрольного уровня ($IC_{50} = 25,07 \pm 4,11$ мкМ). Было исследовано влияние потенцирующей концентрации ионов Mg^{2+} на зависимость связывания [3H]-МК-801 от концентрации аргинолобатина в инкубационной среде. В результате установлено, что в присутствии 0,5 мМ Mg^{2+} аргинолобатин теряет свое потенцирующее действие на специфическую абсорбцию [3H]-МК-801 и сохраняет только ингибирующее влияние ($IC_{50} = 31,48 \pm 4,25$ мкМ). Эти данные свидетельствуют о проявлении ионами магния конкуренции по отношению к аргинолобату за участки, способные аллостерически вызывать увеличение сродства рецептора к МК-801.

Далее нами было обнаружено, что присутствие в инкубационной среде насыщающей концентрации Mg^{2+} (50 мМ), максимально подавляющей связывание [3H]-МК-801 (примерно 60% от контроля), приводило к отсутствию какого-либо выраженного эффекта аргинолобатина на связывание. Это говорит о наличии конкуренции между Mg^{2+} и аргинолобатином за низкоаффинные участки, взаимодействие с которыми приводит к уменьшению связывания [3H]-МК-801.

Как известно, N,N,N',N'-тетраметил-1,3-пропандиамин взаимодействует с полиаминными участками на NMDA-рецепторе (Williams et al., 1989). В экспериментах показано, что N,N,N',N'-тетраметил-1,3-пропандиамин незначительно увеличивает (примерно на 20% от контроля) связывание [3H]-МК-801. Максимальное увеличение [3H]-МК-801 наблюдалось при концентрациях N,N,N',N'-тетраметил-1,3-пропандиамина от 1 до 50 мкМ. ($EC_{50} = 5,29 \pm 0,47$ мкМ). Более высокие концентрации этого вещества (>50 мкМ) подавляли специфическое связывание [3H]-МК-801. Двухфазность действия N,N,N',N'-тетраметил-1,3-пропандиамина, по всей видимости, объясняется его первоначальной оккупацией высокоаффинных полиаминных участков (1-50 мкМ), приводящей к стимулированию связывания [3H]-МК-801, и последующей оккупацией низкоаффинных полиаминных участков (>50 мкМ), приводящей к ингибированию связывания. Присутствие в инкубационной среде насыщающих концентраций глутамата и глицина (по 100 мкМ) усиливало потенцирующее действие N,N,N',N'-тетраметил-1,3-пропандиамина на связывание [3H]-МК-801. Максимальная амплитуда

эффекта увеличения связывания составляла более 50%. Эти данные указывают на наличие синергизма во взаимодействии между высокоаффинным полиаминным участком и участками, связывающими глутамат и глицин.

Для определения возможного действия аргиолобатина на участки NMDA-рецептора, взаимодействующих с полиаминами, было исследовано влияние аргиолобатина на связывание [^3H]-МК-801 с фракцией синаптических мембран в присутствии потенцирующей концентрации N,N,N',N'-тетраметил-1,3-пропандиамина (рис.3). При этом показано, что присутствие полиамина в инкубационной среде приводит к исчезновению потенцирующего действия токсина, сохраняющееся в присутствии глутамата и глицина. Наблюдаемая конкуренция между аргиолобатином и N,N,N',N'-тетраметил-1,3-пропандиамином является доказательством общности участков связывания для данных лигандов.



По оси абсцисс:

1 - концентрация аргиолобатина;
2 - аргиолобатин на фоне насыщающей концентрации N,N,N',N'-тетраметил-1,3-пропандиамина $P < 0,05 (n = 5-8)$.

Рис.3. Влияние аргиолобатина на связывание [^3H]-МК-801 с фракцией синаптических мембран мозга крыс.

Полученные экспериментальные данные в целом свидетельствуют, о наличии конкуренции между Mg^{2+} и аргиолобатином за низкоаффинные участки, взаимодействие с которыми приводит к уменьшению связывания [^3H]-МК-801 и наличия синергизма во взаимодействии между высокоаффинным полиаминным участком и участками, связывающими NMDA-рецептора.

Для исследования влияния эффектов аргиолобатина на транспорт Ca^{2+} через NMDA-рецептор, было изучено его действие на связывание [^3H]-нитрендипина, специфического блокатора Ca^{2+} -каналов L-типа с мембранами из мозга крыс. При этом показано, что в концентрациях от 0,01 до 0,1 мкМ аргиолобатин увеличивает связывание [^3H]-нитрендипина с синаптическими мембранами. Величина полумаксимального потенцирующего эффекта токсина EC_{50} была равна $0,16 \pm 0,03$ мкМ. Связывание 1 мкМ [^3H]-нитрендипина, наблюдаемое при отсутствии токсина в инкубационной среде, соответствует 100%. Максимальное увеличение связывания [^3H]-глутамата (на 50-60% от контрольной величины) наблюдалось в присутствии 10 мкМ аргиолобатина. При концентрациях аргиолобатина, превышающих 10 мкМ,

данный токсин ингибировал связывание [^3H]-нитрендипина. Ингибирование достигало максимального значения (70% от контроля) в присутствии в инкубационной среде 50 мкМ аргиолобатина. Более высокие концентрации токсина не приводили к дальнейшему подавлению связывания, что указывает на отсутствие конкуренции между аргиолобатином и нитрендипином.

Полученные экспериментальные данные в целом, свидетельствуют о том, что аргиолобатин взаимодействует, как минимум, с двумя участками Ca^{2+} -каналов: низкоаффинными (конкурирует с ионами Mg^{2+}), взаимодействие с которыми приводит к уменьшению связывания [^3H]-МК-801 и наличию синергизма во взаимодействии между высокоаффинным полиаминным участком и участками, связывающими NMDA-рецептор.

В целом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что компонент А-V-2-1 обладает свойством антагониста смешанного типа подобно глутамату (Choi, 1993; Lazarewicz, 1996), вызывает перевозбуждение NMDA-рецепторов, приводит к открытию кальциевых каналов и мощному притоку ионов Ca^{2+} .

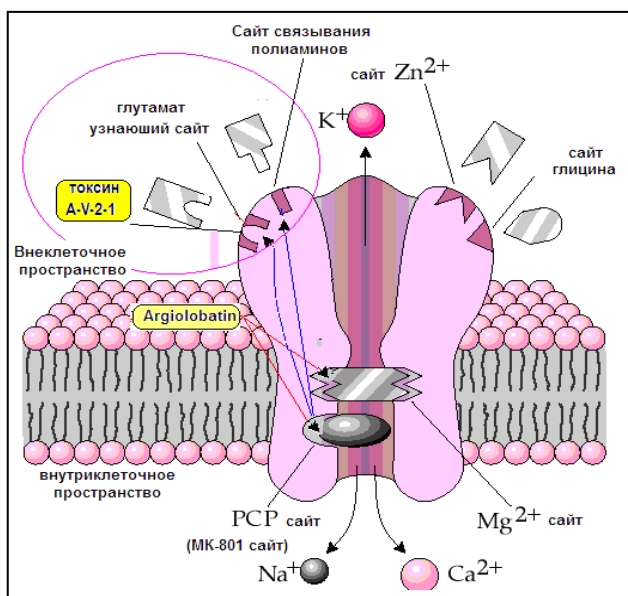


Рис. 4. Влияние токсинов А-V-2-1 и аргиолобатина на проводимость ионов Ca^{2+} , через узнающий сайт глутамата и связывающий участки NMDA-рецептора, соответственно.

Взаимодействие аргиолобатина с NMDA-рецептором одновременно сказывается на функциональном состоянии различных участков рецептора, управляющих ионным каналом и его десенситизацией.

Следующими объектами исследований были яды пауков *Anemesia sp.* и *Eresus niger*. Яды этих пауков отличаются от ядов других пауков наличием в них фосфолипазной A_1 активности, при этом они существенно отличаются от фосфолипазы A_2 ядов змей низкой токсичностью при внутрибрюшинном и внутривенном введениях.

При исследовании токсикологических характеристик яда паука *Anemesia sp.* показано, что цельный яд проявляет низкую токсичность на теплокровных животных (белых мышах) при внутрибрюшинном и

внутривенном введениях (LD_{50} составляет 250 ± 25 мг/кг). Однако, при введении раствора яда паука *Anemesia sp.* непосредственно внутрь брюшка (в область полости груди) тараканам, токсичность (LD_{50}) было равно 10 ± 2 мкг/мкл. У тараканов яд вызывал паралич с характерными симптомами: в первые минуты после введения наблюдается некоторая заторможенность, через 2-3 минуты переходящее в возбуждение, насекомые становятся более подвижными, через 30-40 минут после введения яда отмечается нарушение координации и в конечном итоге обездвиживание насекомых.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в яде паука *Anemesia sp.* содержатся компоненты, преимущественно действующие на нервно-мышечную систему насекомых.

Эти результаты были подтверждены в электрофизиологических исследованиях. При относительно низких концентрациях (1-5 мкг/мл) яд паука *Anemesia sp.* вызывает увеличение частоты миниатюрных возбуждающих постсинаптических потенциалов (МВПСП) саранчи и снижение квантового состава возбуждающих постсинаптических потенциалов (ВПСП). При увеличении концентрации яда (до 50 мкг/мл) наблюдалось увеличение длительности пачек и снижение межпачечного интервала, однако достоверного изменения частоты МВПСП в пачках и их амплитуды не наблюдалось (Каликулов и др., 1995).

Из яда паука *Anemesia sp.* с помощью ионообменной хроматографии и гельфильтрации на колонках с Toyopearl TSK-OEAE 650 и сефадексе G-75 соответственно, выделены нейротоксические фракции (An^b4 , An^b5 и An^b7). При электрофорезе на 15% ПААГ с SDS в присутствии стандартных маркеров установлены молекулярные массы этих компонентов: фракции An^b4 , ~13-15, An^b5 ~5 и An^b7 ~1 кДа.

Фракции An^b4 и An^b5 в концентрациях 75-100 мг/кг у мышей при внутрибрюшинном введении вызывали состояние возбуждения, потерю координации движений, парезы конечностей. Летальный исход под действием фракций An^b4 и An^b5 , наблюдался через 30-35 часов. Другая фракция An^b7 в этих концентрациях, а также в более высоких концентрациях (до 200 мг/кг массы) при внутрибрюшинном и внутривенном введениях не проявляла токсичность. Однако, при введении растворов фракции An^b7 непосредственно внутрь черепа (лобной гребень - субдуральное пространство мозга) мышей выраженная токсичность проявлялась уже при концентрации 1,0 мкг/мкл, тогда как фракции An^b4 и An^b5 не проявляли токсичность даже при 10,0 мкг/мкл. Очень высокая токсичность фракции An^b7 при внутричерепном введении наводит на мысль, что данная фракция действует непосредственно на нейроны центральной нервной системы.

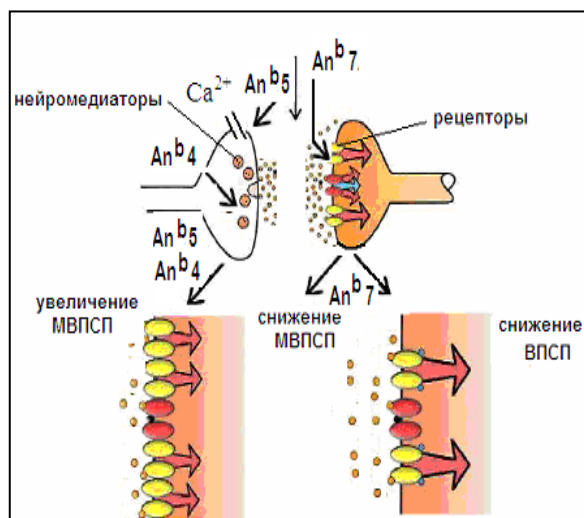
При исследовании ферментативной активности фракций обнаружено, что фракция $An4$ обладает фосфолипазной A_1 активностью. Следовательно, токсичность, вызываемая данной фракцией, может быть обусловлена её фосфолипазной активностью.

При тестировании на нервно-мышечных синапсах саранчи фракции An^b4 и An^b5 вызывали сильное увеличение частоты МВПСП. При этом частота и

амплитуда гигантских МВПСП, индуцируемых компонентом An^b5 , прямо зависела от концентрации Ca^{2+} в среде. Эти данные свидетельствуют о том, что компонент An^b5 активирует Ca^{2+} -каналы пресинаптической мембраны, в результате чего генерируются гигантские МВПСП (рис. 5).

Другая фракция An^b7 вызывала снижение амплитуды как МВПСП, так и ВПСП, а также подавляла ответы на аппликацию глутамата. Из этого можно заключить, что данная фракция реализует свои эффекты на уровне постсинаптической мембраны.

При исследовании действия яда другого паука *Eresus niger* на нервно-мышечный препарат лягушки, омытый буферным раствором, обнаружено, что яд эффективно вызывает снижение частоты МПКП, что сопровождается



Фракция $An4$ вызывала увеличение частоты МВПСП;

Фракция $An5$ активирует Ca^{2+} -каналы пресинаптической мембраны, в результате чего генерируются гигантские МВПСП;

Фракция $An7$ вызывала снижение амплитуды как МВПСП, так и ВПСП, реализуя свои эффекты на уровне постсинаптической мембраны.

Рис. 5. Схема действия фракций яда паука *Anemesia sp.* на синаптические потенциалы в нервно-мышечных синапсах саранчи.

увеличением кальциевой проводимости и поступлением Ca^{2+} в нервное окончание.

Наряду с действием на частоту МПКП, т.е. на спонтанную секрецию медиатора, яд также оказывает заметное влияние и на вызванные ответы, т.е., на потенциал концевой пластинки (ПКП), в основном на их амплитуду. Изменение амплитуды ПКП также происходит трехфазно. Наблюдение за изменениями частоты МПКП и амплитуды ПКП показывает, что первоначально происходит подавление вызванных ответов, а затем спонтанной активности. Полученные экспериментальные данные показывают, что эффекты, вызываемые ядом паука *Eresus niger*, сходны с эффектами пресинаптических нейротоксинов ядов змей.

Но яд паука *Eresus niger* существенно отличается от ядов змей низкой токсичностью. Токсичность (LD_{50}) цельного яда у белых мышей при внутрибрюшинном введении оказалась 120-150 мг/кг. При этом яд в концентрации 100 мкг/г вызывал нарушение координации, паралич конечности: в первые минуты наблюдалась некоторая заторможенность, через 10-15 минут мыши становятся более подвижными, но отмечалось нарушение координации движений.

С целью выявления компонента, ответственного за вышеописанные эффекты, с помощью гельфильтрации и ионообменной хроматографии на колонках с Toyoparl CM-TSK 60F и ионообменной хроматографии с Toyoparl CM-TSK 650 из яда паука *Eresus niger* была выделена фракция E-VIII-4 (~ 14000Да), блокирующая синаптическую передачу.

Вследствие химической очистки токсичность фракции E-VIII-4 значительно возрастает по сравнению с цельным ядом и равна $30 \pm 2,5$ мг/кг (мыши) и 75 мкг/г (тараканы), соответственно.

При исследовании ферментативной активности было обнаружено, что фракция E-VIII-4 обладает фосфолипазной A_1 активностью (Атакузиев и др., 1991). Следовательно, эффекты, вызываемые фракцией E-VIII-4, могут быть обусловлены его фосфолипазной активностью.

Возможно, что компонент E-VIII-4 яда паука *Eresus niger*, обладающий фосфолипазной A_1 активностью нарушает процесс секреции медиатора, взаимодействуя с мембранами нервных окончаний и гидролизируя их фосфолипиды.

В экспериментах на нервно-мышечных синапсах лягушки фракция E-VIII-4, в отличие от других фракций, вызывала существенное изменение частоты МПКП. При этом первоначально наблюдалось незначительное снижение частоты МПКП с последующим постепенным увеличением частоты МПКП до 240 с^{-1} . В заключительной стадии происходило вторичное снижение частоты МПКП. Эти результаты указывают на то, что фракция E-VIII-4 вызывает истощение запасов медиатора или вызывает существенные нарушения механизма нейросекреции.

Таким образом, полученные результаты исследований показывают, что фракция E-VIII-4 яда паука *Eresus niger*, обладает фосфолипазной активностью и подобно пресинаптическим токсинам змей вызывает существенные нарушения Ca^{2+} -зависимых процессов и механизма секреции медиатора пресинаптических мембран нервных клеток.

Несомненно, эти нейротоксины являются новыми инструментами исследований процесса секреции медиатора и глутаматергических синапсов.

С целью поиска новых модуляторов Ca^{2+} -зависимых процессов было исследовано действие яда паука *A. labirintica* и тарангула *Allohogna singoriensis*.

В токсикологическом плане яды пауков семейства *Agelenidae* не обладают высокой токсичностью для теплокровных. В исследовании токсичности яда паука *Agelena labirintica* на мышах показано, что при внутрибрюшинном введении величина LD_{50} была равна 150 ± 10 мг/кг массы. Близкие величины токсичности установлены при внутривенном введении 145 ± 10 мг/кг, тогда как при введении растворов яда непосредственно внутрь мозга (внутричерепное введение), токсичность проявлялась уже при концентрации 1,5 мкг/мкл. При этом вначале яд вызывал состояние возбуждения, затем потерю координации движений, парезы конечностей мышей и некоторую заторможенность.

Чтобы выяснить, каким механизмом действия обладает яд паука *A. labirintica*, были проведены электрофизиологические исследования на нервно-мышечных синапсах лягушки.

При этом было показано, что яд вызывает снижение частоты миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и существенно снижает амплитуду потенциалов концевой пластинки (ПКП) лягушки. Яд паука также эффективно снижает частоту МПКП на уровне калиевой деполяризации.

С целью выделения компонента, ответственного за блокирование пресинаптических Ca^{2+} -каналов, яд паука *A. labirintica* был подвергнут фракционированию. С помощью метода гельфильтрации на колонках с сефадексом G-75 и ультрагелем AcA 202 из яда удалось выделить нейротоксический компонент Agl-1, специфически блокирующий Ca^{2+} -каналы пресинаптической мембраны нервно-мышечных синапсов лягушки.

По данным электрофореза и электрофокусирования, Agl-1 содержит один компонент с молекулярной массой около 1000 Да (Насиров и др., 1995).

Этот токсин при внутрибрюшинном и внутривенном введении почти не проявлял токсичность (ЛД_{50} : 125 ± 10 мг/кг и $112,5 \pm 10$ мг/кг массы, соответственно), тогда как при внутримозговом введении ЛД_{50} была равна $1,0 \pm 0,25$ мг/кг на мышах. Симптомы токсичности имели нейротоксический характер.

Электрофизиологические результаты в целом свидетельствуют о том, что токсин Agl-1, выделенный из яда паука *A. labirintica* не влияет на индукцию выхода кальция из внутриклеточных систем нервного окончания, а блокирует кальциевые каналы пресинаптической мембраны нервно-мышечных синапсов лягушки.

Несомненно, этот нейротоксин найдет широкое применение в качестве инструмента при изучении особенностей функционирования Ca^{2+} -каналов пресинаптической мембраны позвоночных животных (Насиров и др., 1995).

При исследовании токсикологической характеристики яда другого паука тарантула *Allochogna singoriensis* выявлено, что этот яд проявляет относительно высокую токсичность на мышах при внутрибрюшинном введении, в сравнении с выше исследованными ядами других пауков. При внутрибрюшинном введении белым мышам величина ЛД_{50} для яда составляет $30 \pm 2,0$ мг/кг от массы тела. Но при внутримозговом введении, токсичность яда была сравнительно низкая (20 мкг/мкл) относительно ядов пауков *Argiope lobata*, *Anemesia sp.* и *Agelena labirintica*. Симптомы отравления также отличались от действия предыдущих ядов пауков. В этом случае не наблюдалось резкого возбуждения и хаотических движений после инъекции яда, через несколько минут наблюдалась потеря координации, парезы конечностей и некоторая заторможенность.

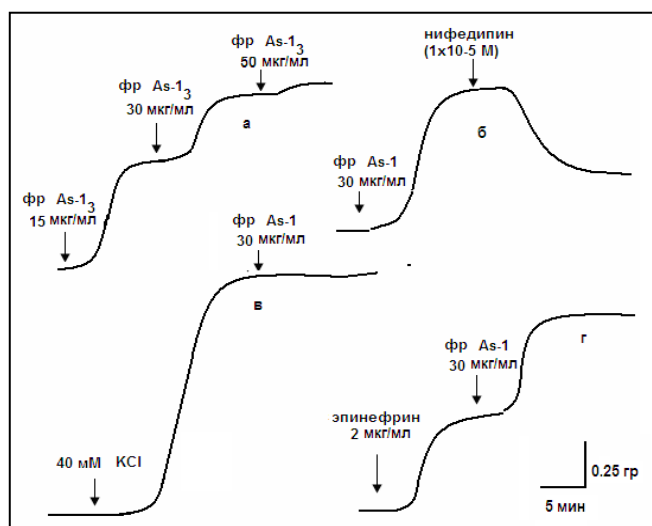
Полученные результаты свидетельствуют о том, что яд паука *A. singoriensis* преимущественно действует на двигательную систему теплокровных.

С целью раскрытия механизма действия яда *A. singoriensis*, было исследовано его влияние на сократительную активность (СА) и мембранный потенциал препаратов ГМК аорты крысы. При этом обнаружено, что яд в концентрации 20 мкг/мл вызывает усиление СА в гладкомышечных клетках. Дальнейшее увеличение концентрации яда не изменяло СА. Увеличение СА в присутствии тетродотоксин (ТТХ - блокатора потенциал-зависимых Na^+ -каналов) свидетельствовало о том, что действие яда этого паука не связано с модификацией Na^+ -каналов. Исследование действия яда на потенциал действия (ПД) мышечных волокон показало, что он не влияет на первую и третью фазы ПД, но заметно увеличивает вторую, степень увеличения которой прямо зависит от открытия и закрытия особых мембранных каналов или пор, через которые легко проходят ионы.

Анализ полученных данных свидетельствовал о том, что в яде паука *A. singoriensis* содержится, компонент, который способен активировать Ca^{2+} -каналы гладких мышц.

С помощью комбинации гельфильтрации и ионообменной хроматографии (на колонках с Toyopearl TSK-60 и TSK CM-650) из яда паука *A. singoriensis* выделена электрофоретическая гомогенная фракция As-1₃, которая вызывала усиление СА мышечных волокон почти в 3 раза эффективнее, чем цельный яд. Её выход составил 0,35%. На основании результатов SDS-PAGE установлена приблизительная молекулярная масса, которая была равно 9-11 кДа.

При добавлении фракции As-1₃ в среду (в раствор Кребса) она вызывает деполяризацию мембран ГМК и их сокращение. При этом степень мышечного напряжения препарата аорты крысы, вызываемого фракцией As-1₃ была ниже по сравнению с сокращением, вызванным KCl (рис. 6а).



а - влияние фракции As-1₃ на сократительную активность ГМК аорты крыс,
б - то же, при добавлении нифедипина,
в - на фоне KCl-индуцированного сокращения,
г - на фоне эпинефрин-индуцированного сокращения.

Кривые приведены из оригинальных записей.

Рис.6. Влияние фракции As-1₃ на сократительную активность ГМК аорта крысы.

В другой серии экспериментов на фоне эффектов, вызываемых агонистом α -адренергических рецепторов эпинефрином, добавление 30 мкг/мл фракции As-1₃ приводило к дополнительной деполяризации и усилению сокращения препарата аорты на $32 \pm 3\%$ от исходного уровня. Анализ этих результатов показал, что в присутствии эпинефрина, фракция

As-1₃ более заметно действует на уровень мышечного напряжения, чем на мембранный потенциал ГМК.

В присутствии в среде нифедипина (1×10^{-5} М) (блокатора потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов L-типа) фракция As-1₃ (10 мкг/мл) вызывала уменьшение амплитуды сокращений на $37 \pm 3\%$ по сравнению с амплитудой сокращений, наблюдаемых в отсутствие нифедипина (рис. 6б).

Полученные данные свидетельствуют о том, что наблюдаемые эффекты фракции As-1₃ яда тарантула возможно объясняются ее взаимодействием как с потенциал-, так и рецептор-зависимыми Ca^{2+} -каналами, и как активатор Ca^{2+} -каналов, фракция As-1₃ представляет большой интерес в качестве инструмента исследования фармакологии кальциевых каналов.

В четвертой главе изложены результаты исследований токсикологических особенностей ядов скорпионов *Mesobuthus caucasicus* и *Mesobuthus sp.* и их компонентов.

В отличие от нейротоксических компонентов ядов пауков, в основе механизма действия нейротоксинов скорпионов лежит замедление скорости инактивации быстрых натриевых каналов электровозбудимых мембран, что сопровождается развитием стойкой деполяризации. Это вызывает развитие широкого спектра патологических реакций: фазное и тонические сокращения скелетной и гладкой мускулатуры, изменение тонуса сосудов и деятельности сердца, поражение функций нервной и эндокринной систем. Действующим началом являются нейротоксические полипептиды скорпионов, имеющие выраженную видовую специфичность. Одни из них избирательно действуют на мембраны нервных клеток млекопитающих, другие действуют преимущественно на насекомых (так называемые инсектотоксины), а некоторые из них имеют токсичность для ракообразных.

Из ядов скорпионов *Mesobuthus caucasicus* и *Mesobuthus sp.* методами гельфильтрации и ионообменной хроматографии выделены фракции с высокой избирательностью для теплокровных и насекомых. Дальнейшая очистка этих активных фракций была проведена совместно с сотрудниками ИБОХ АН РУз (Сагдиевым Н. и Зиявуддиновым Дж.) методом ВЭЖХ на колонке Nucleosil C18 в градиенте 5-60% MeCN (ацетонитрила). При этом из фракций Mc₍₅₋₈₎ – II; Mc₍₅₋₈₎ – X и Mc₍₅₋₈₎ – XV яда скорпиона *Mesobuthus caucasicus* и из фракций Msp₍₅₋₈₎ – VI и Msp₍₅₋₈₎ – XII яда скорпиона *Mesobuthus sp.* выделены индивидуально чистые токсины с молекулярной массой: McITX1 ~3 кДа; McITX3 ~3 кДа; McITX2 ~7 кДа и Msp₍₅₋₈₎ – VI-13 ~7 кДа; Msp₍₅₋₈₎ – XVII-4 ~3 кДа; Msp₍₅₋₈₎ – XII-5 ~3 кДа, соответственно.

При тестировании полученных фракций на насекомых было показано, что токсины McITX1, McITX3 и Msp₍₅₋₈₎ – VI-13 в концентрациях 1,0-20,0 мкг/г при инъекции тараканам вызывали подавление их двигательной активности, проявлявшейся в резком замедлении их движений, с последующей иммобилизацией и слабой реакцией на тактильные раздражения, сопровождающиеся вялым параличом и смертью насекомых. Напротив, введение McITX2 и фракции Msp₍₅₋₈₎ – XII-5 в концентрациях 1,0-20,0 мкг/г тараканам приводило к медленному возбуждению, которое проявлялось как

интенсивные хаотические движения насекомых, которые сохранялись в течение нескольких часов и сопровождались спастическим параличом и смертью насекомых. Результаты токсичности этих токсинов на разных насекомых приведены в табл. 1.

Таблица 1

Токсичность фракций яда скорпионов *Mesobuthus caucasicus* и *Mesobuthus sp.* на разных насекомых (n=5-8).

Фракции	на мучных червях, мкг/г		на хлопковой совке, мкг/г		на таракане, мкг/г	
	эффек.доз	ЛД ₅₀	эффек.доз	ЛД ₅₀	эффек.доз	ЛД ₅₀
McITX1	1,5±0,25	12,0±0,5	5,0±0,5	20±2,0	1,0±0,25	5,0±0,25
McITX2	2,5±0,2	17,5±0,5	10,0±0,5	30±1,5	1,0±0,1	7,5±0,5
McITX3	1,5±0,25	2,5±0,5	5,0±0,5	22,5±1,0	10±0,5	5,5±0,25
Msp(5–8) -VI-13	1,5±0,25	7,5±0,5	2,5±0,5	25,0±2,0	1,0±0,25	10,0±0,5
Msp(5–8) -XII-5	2,5±0,2	5,0±1,0	5,0±0,5	22,5±1,5	1,0±0,25	7,5±0,5
Msp(5–8) -XVII-4	1,5±0,25	10,0±0,5	2,5±0,5	30,0±2,0	1,0±0,25	12,5±0,05

Примечание: при P<0,05 показатели были приняты за достоверные

В электрофизиологических экспериментах на нервно-мышечных препаратах таракана токсины McITX1 и McITX3 в концентрациях 0,1-0,5 мкг/мл вызывали увеличение частоты миниатюрных возбуждающих постсинаптических потенциалов (МВПСП), которое сопровождалось деполяризацией мембранного потенциала и блоком синаптической передачи. Напротив, вызванное McITX2 и Msp(5–8) - XII-5 увеличение частоты миниатюрных потенциалов, сопровождалось медленной и слабой деполяризацией мембранного потенциала и интенсивными сокращениями мышечных волокон.

Полученные результаты показывают, что в яде скорпионов *Mesobuthus caucasicus* и *Mesobuthus sp.* имеются токсические компоненты с высокой избирательностью для насекомых разных систематических групп. Безусловно, эти компоненты представляют особый интерес в связи с возможностью использования их при разработке новых подходов борьбы с насекомыми-вредителями сельскохозяйственных культур.

Кроме того, эти токсины могут быть использованы в качестве инструментов исследования ионных каналов, играющих ключевую роль в функционировании электровозбудимых мембран.

Несомненно, эти нейротоксины являются новыми инструментами фармакологии в исследовании ионных каналов и могут быть использованы в раскрытии молекулярного механизма возбуждения мембран, ионных каналов, играющих ключевую роль в функционировании возбудимых мембран.

В пятой главе было исследовано действие ядов змей гюрзы *Vipera lebetina* и эфы *Echis multisquamatus* и их компонентов на отдельные звенья системы гемостаза (коагуляционное и тромбоцитарное) в норме и патологии.

В отличие от ядов насекомых яды змей обладают сложным комплексом биологически активных соединений: ферментов, токсических полипептидов, действующих на Ca^{2+} - зависимые процессы системы гемостаза.

В этом отношении не составляют исключение яды гюрзы *Vipera lebetina* и эфы *Echis multisquamatus*, токсический эффект которых обусловлен действием сложных ферментов и полипептидов на систему свертывания крови в присутствии ионов кальция.

При исследовании токсикологических особенностей ядов змей гюрзы *Vipera lebetina* и эфы *Echis multisquamatus* на мышах обнаружено, что симптомы отравления сопровождаются отеком разной степени в зависимости от концентрации яда (0,6-6,0 мг/кг массы). Среди общих проявлений интоксикации значительное место занимали симптомы нарушения координации движений, судороги, гиподинамия и тромбгеморрагические синдромы (кровоизлияния на слизистых оболочках кожи, кровотечения). Величина ЛД₅₀ для ядов гюрзы и эфы составила 2,23 мг/кг и 4,92 мг/кг, соответственно.

При исследовании действия ядов гюрзы и эфы на плазму крови донора показано, что в присутствии ионов кальция (0,027 М) яды гюрзы и эфы в концентрации 10 мкг/мл, без добавления фибриногена, сами вызывают свертывание плазмы донора в течение 30-35 сек. и 18-20 сек., соответственно. Если добавить в среду инкубации чистый фибриноген, время свертываемости ядом гюрзы значительно ускоряется до 15-18 сек., тогда как под действием яда эфы практически не меняется.

Метод активированного времени рекальцификации плазмы (АВРП) основан на измерении времени свертывания тромбоцитарной плазмы при добавлении в нее оптимального количества (0,025 М) кальция хлорида или каолина, что обеспечивает активизацию факторов свертывания. Удлинение или укорачивание АВРП может зависеть от: 1 - тромбоцитарного фактора; 2 - активности и количества большинства плазменных факторов свертывания (кроме факторов VII и XIII); 3 - содержания в плазме ингибиторов свертывания (гепарина).

При исследовании влияния ядов гюрзы и эфы на время рекальцификации свертывания плазмы обнаружено, что в зависимости от

дозы яда гюрзы время свертывания сокращается, тогда как с ядом эфы АВРП практически не изменяется.

Укорочение времени под влиянием яда гюрзы указывают на общую тенденцию к гиперкоагуляции и может быть обусловлено активацией большинства плазменных факторов свертывания, кроме факторов VII и XIII.

С целью изучения влияния яда гюрзы на общий коагуляционный потенциал были проведены исследования на тромбоэластографе.

Результаты исследований показывают, что яд гюрзы в отсутствии ионов кальция *in vitro* не влияет на тромбопластинообразование. При добавлении в среду инкубации ионов кальция потенцируется процесс тромбопластинообразования. Вместе с тем обнаружено, что формирование фибринового сгустка зависит от концентрации ионов кальция в инкубационной среде. С увеличением концентрации кальция укорачивается время образования (R) тромбина и фактора Ха, а также (K) формирование сгустка. При этом время формирования прочности (ma) и эластичности сгустка (E) значительно сокращается.

В других экспериментах, при разных концентрациях яда гюрзы, в присутствии 0,025 М ионов кальция, процесс тромбопластинообразования также менялся. С увеличением концентрации яда ускоряются первая и вторая фазы свертывания - процесс тромбообразования и формирования фибринового сгустка, но при этом тормозился процесс стабилизации формирования волокна фибрина. Понижение прочности (ma) свидетельствует о деградации фибриногена.

Эти результаты могут свидетельствовать о том, что действие яда гюрзы связано с ее влиянием как на начальные стадии свертывания - процесс тромбопластинообразования, так и на процессы формирования фибринового сгустка.

Чтобы проверить это предположение, было исследовано влияние яда гюрзы на тромбиновое и протромбиновое время.

При исследовании влияния яда гюрзы *Vipera lebetina* на тромбиновое время - обнаружено, что яд гюрзы в концентрациях (5-40 мкг/мл) в отсутствии ионов кальция вызывает дозозависимое ингибирование превращения фибриногена в фибрин, вызванное тромбином. При этом образуются фибриновые нити, но не происходит полимеризации и стабилизации фибрина. Удлинение тромбинового времени под влиянием яда гюрзы может быть вызвано дисфибриногенемией.

В обратном случае, если предварительно в плазме яд гюрзы инкубировать с тромбином, а затем (через 3 минуты) добавить фибриноген и кальций, время свертывания плазмы укорачивается в зависимости от концентрации яда гюрзы. При этом ускоряется процесс превращения фибриногена в фибрин, его полимеризация и стабилизация.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что яд гюрзы не влияет на активность тромбина, главным образом действуя на факторы превращения фибриногена в фибрин.

При исследовании влияния яда гюрзы на протромбиновое время обнаружено, что яд гюрзы дозозависимо укорачивает время свертываемости крови. По ускорению протромбинового времени (ПТВ) на фоне яда можно судить об активации факторов внешнего механизма образования протромбиназы (фактора VII). Чтобы проверить это предположение, было исследовано влияние яда гюрзы на АЧТВ-тест, который чувствителен к дефициту всех факторов свертывания, кроме VII и не зависит от дефицита тромбоцитов или их функциональной недостаточности.

При исследовании влияния яда гюрзы *Vipera lebetina* на АЧТВ обнаружено, что яд в концентрациях (5-50 мкг/мл) дозозависимо укорачивает АЧТВ. Эти результаты свидетельствуют о том, что в яде содержатся компоненты, активирующие один из факторов свертывания (факторы XII, XI, IX, VIII), кроме фактора VII.

Таким образом, ускорение протромбинового времени на фоне яда гюрзы *Vipera lebetina*, свидетельствует об активации внешнего механизма свертывания (фактор VII). Укорачивание АЧТВ и АВРП при действии яда гюрзы свидетельствует об активации одного из факторов внешнего механизма свертывания (фактора V и II), кроме фактора VII.

С целью выделения компонентов, ответственных за активацию факторов внешнего механизма свертывания, яд гюрзы подвергался фракционированию. С помощью гельфильтрации и ионообменной хроматографии на колонках с гелем Тоуорепарл HW TSK-60F и CM-TSK— выделены несколько фракций с прокоагулянтной активностью. Наиболее заметной прокоагулянтной активностью из них обладала фракция Г-III-2.

При исследовании токсичности фракции Г-III-2 обнаружено, что ее токсичность в три раза ниже токсичности цельного яда и ЛД₅₀ равна 7,5 мг/кг (ЛД₅₀ цельного яда 2,25- 2,5 мг/кг).

В тоже время, фракция Г-III-2 обладает протеазной активностью и её активность в 2,5 раза выше, чем в цельном яде.

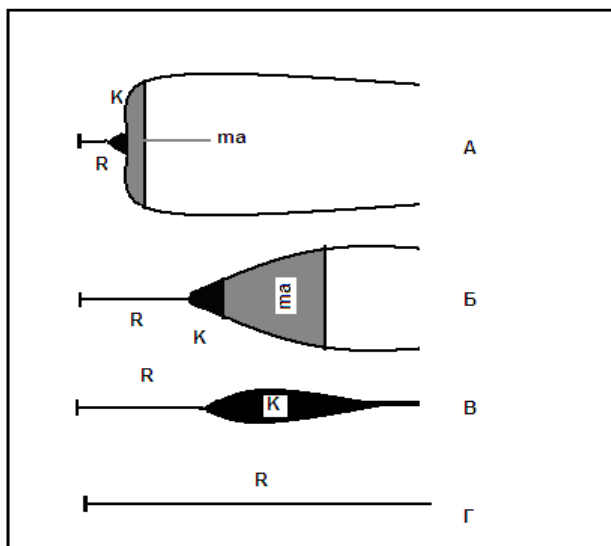
При электрофоретических исследованиях с использованием трис-глицинового буфера, рН 8,2 в 7,5% ПААГ установлена гомогенность фракции Г-III-2. Для оценки молекулярной массы фракции Г-III-2 провели хроматографию на колонке с сефадексом G-100, откалиброванной различными белками: бычим альбумином (67000 Да), яичным альбумином (45000 Да), миоглобином (17000 Да) и цитохромом С (12300 Да), а также голубым декстраном (200000 Да - для определения свободного объема колонки). Фракция Г-III-2 выходила с колонки в объеме элюата, расположенного между объемами выхода яичного альбумина и миоглобина. На основании выхода объема фракции можно заключить, что молекулярный вес фракции Г-III-2 находится в промежутке 25000- 30000 кДа.

Эти результаты были подтверждены методом электрофореза в 15% ПААГ с SDS в присутствии стандартных маркеров.

Фракция Г-III-2, протеаза с молекулярным весом 25-30 кДа, с прокоагулянтной активностью, условно была названа как лебетаза, а проведенные с ней тесты как лебетазными.

В присутствии ионов кальция (0,027M) лебетаза оказывает потенцирующее действие на процесс тромбопластинообразования подобно цельному яду и её действие связано с влиянием как на начальные стадии свертывания - процесс тромбопластинообразования, так и на процессы формирования фибринового сгустка.

В следующих экспериментах было исследовано действие лебетазы на экарин-зависимую коагуляцию (рис.7).



А - контроль в отсутствии лебетазы, концентрация экарина 1 ед; в отсутствии ионов кальция в инкубационной среде. Б, В, Г - при концентрациях лебетазы 5 мкг/мл; 10 мкг/мл и 20 мкг/мл, соответственно.

Тромбоэластограммы приведены из оригинальных записей.

Рис. 7. Дозозависимое влияние лебетазы яда гюрзы на экарин-вызванное тромбообразование и формирование фибринового сгустка

Известно, что экарин, выделенный из яда эфы *Echis carinatus*, активирует протромбин независимо от присутствия ионов кальция. При этом показано, что лебетаза, в отсутствии ионов кальция в инкубационной среде, дозозависимо (5-10 мкг/мл) удлиняет время экарин-вызванного тромбообразования и формирование фибринового сгустка, а при концентрации 20 мкг/мл – полностью блокирует этот процесс. Удлинение протромбинового времени при нормальном тромбиновом времени указывает на ингибцию внешнего пути активации свертывания крови, то есть на дефицит VII, V и II факторов.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что лебетаза, в отсутствии ионов кальция, вызывает деструкцию фибриногена и снижает коагуляционный потенциал за счет блокирования процесса тромбообразования и нарушает полимеризацию фибрин-мономера, угнетает агрегацию тромбоцитов.

При исследовании влияния лебетазы на агрегацию тромбоцитов обнаружено, что она в присутствии 0,005 М CaCl_2 дозозависимо (1-10 мкг/мл) вызывает снижение АДФ- и адреналин-индуцированной агрегации. При концентрации лебетазы 10 мкг/мл максимальное ингибирование АДФ- и адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов было равно 43% и 55%, соответственно.

Известно, что эффекты АДФ и адреналина реализуются через специфические рецепторы тромбоцитарной мембраны и обусловлены

изменением активности кальция в тромбоцитах, который в качестве вторичного мессенджера играет ключевую роль в регуляции функциональной активности тромбоцитов. Возможно, лебетаза проявляет свои эффекты на уровне мембран, взаимодействуя с α -адренорецепторами плазматической мембраны и её действие связано с модуляцией мембран и изменением проницаемости ионов Ca^{2+} .

Для выяснения механизма действия лебетазы на Ca^{2+} -зависимые процессы, исследовано её влияние на сократительную активность гладкомышечных клеток (ГМК) аорты крысы. Известно, что тонические компоненты норадреналин-индуцированного ответа зависят от входа внеклеточного Ca^{2+} через рецептор-управляемые Ca^{2+} -каналы. При этом показано, что лебетаза приводит к угнетению как фазных, так и тонических компонентов сократительного ответа ГМК аорты, индуцированного как гиперкалиевым раствором, так и норадреналином. Итак, ингибирование лебетазой тонических компонентов сократительного ответа ГМК аорты позволяет предположить, что её эффект обусловлен нарушением входа внеклеточного Ca^{2+} через рецептор-управляемые Ca^{2+} -каналы. Ингибирование фазных компонентов норадреналин-индуцированного сократительного ответа ГМК аорты, которые, как известно, зависят от выхода Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо, свидетельствует о влиянии лебетазы на выход Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо.

Таким образом, лебетаза обладает релаксантным действием на сокращение гладкомышечных клеток, индуцированное как гиперкалиевым раствором, так и норадреналином. Релаксантное действие лебетазы на аорту крысы, возможно, связано с её взаимодействием как с сократительными белками ГМК, так и с изменением уровня цитозольного Ca^{2+} .

Эти результаты были подтверждены с помощью флуоресцентных зондов хлортетрациклина (ХТЦ) и Fura-2АМ. При исследовании действия лебетазы на уровень внутриклеточного Ca^{2+} тромбоцитов показано, что лебетаза эффективно уменьшает уровень цитозольного кальция $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и увеличивает мембраносвязанный Ca^{2+} .

Полученные данные, в целом, свидетельствуют о том, что в основе действия лебетазы на АДФ- и адреналин-индуцированную агрегацию тромбоцитов лежат изменения не только уровня мембраносвязанного кальция, но и изменения его внутриклеточной концентрации.

При исследовании действия лебетазы на плазму крови больных ишемическим и геморрагическим инсультом, обнаружено, что при ишемических инсультах наблюдается укорачивание лебетазного времени по сравнению с контрольным показателем и удлинение лебетазного времени при геморрагических инсультах. В отсутствии ионов кальция в инкубационной среде лебетаза вызывает свертываемость плазмы крови больных при более тяжелых формах ВМК. Возможно, это связано с активацией тканевого фактора III и увеличением уровня внутриклеточного кальция в клетках стенки кровяных сосудов и тромбоцитах.

Действительно, исследование уровня $[Ca^{2+}]_i$ с помощью флуоресцентных зондов ХТЦ и Fura-2АМ, при нарушениях сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, показало, что в тромбоцитах больных с ишемическими и геморрагическими осложнениями значительно иммобилизуется Ca^{2+} на мембранных структурах, по-видимому, за счет свободных ионов Ca^{2+} и ионов Ca^{2+} из митохондриального пула.

Исследование сократительной активности ГМК аорты крыс при остром нарушении мозгового кровообращения (ОНМК) показало, что при использовании индукторов сокращения путем введения гиперкалиевого (40 мМ) раствора и норадреналина (1 мкМ) в присутствии ионов кальция наблюдается снижение деполяризации ГМК и рост мышечного напряжения.

Эти результаты показывают, что при экспериментальных формах ОНМК ГМК аорты находятся в состоянии вазоспазма и это связано с нарушением функций кальциевых каналов L-типа и рецептор-управляемых Ca^{2+} -каналов. Увеличение содержания внутриклеточного кальция ГМК приводит к активизации сократительной активности и повышению базального тонуса, вызывая сужение стенок кровеносных сосудов.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при нарушениях сосудисто-тромбоцитарного гемостаза происходит укорачивание времени свертываемости плазмы при действии лебетазы. Это обусловлено взаимодействием лебетазы с мембраносвязанным кальцием и тканевым тромбопластином (фактором III), которые попадая в кровь из эндотелиальных и гладкомышечных клеток при повреждении ткани сосудов активируют плазменные факторы. Взаимодействие лебетазы с мембраносвязанным кальцием и тканевым тромбопластином подобно комплексу (тканевой фактор III-фактор VII) превращает фактор X в фактор Ха (сериновую протеиназу) и приводит к образованию протромбиназы. Это позволяет определить активацию факторов свертывания крови при нарушениях сосудисто-тромбоцитарного гемостаза (рис.8).

Уникальность метода заключается в том, что лебетаза в отличие от эндогенных активаторов - факторов свертывания крови, непосредственно взаимодействует с тканевым тромбопластином (фактором III), который является инициатором активации внешнего механизма свертывания крови.

Учитывая неоднозначное действие некоторых нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) на гемокоагуляционный потенциал, изучены изменения лебетазного времени в различные сроки экспериментального внутримозгового кровоизлияния (ЭВМК) на фоне НПВС.

Механизм действия НПВС заключается в том, что они блокируют активность особого фермента циклооксигеназы (ЦОГ), который способствует образованию в очаге воспаления особых веществ - медиаторов воспаления, приводящих к расширению сосудов и возникновению боли. В норме количество ЦОГ-2 в большинстве тканей незначительно. При воспалительных процессах ее содержание возрастает более чем в 50 раз.

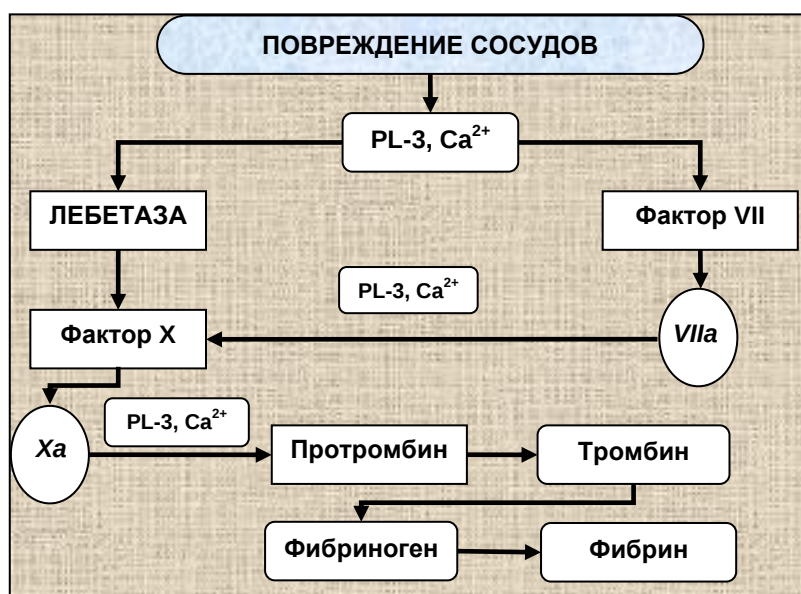


Рис.8. Схема влияния лебетазы на активацию фактора X.

Очевидно, основное терапевтическое действие лекарственных средств обусловлено влиянием на ЦОГ-2, а нежелательные побочные эффекты связаны с угнетением ЦОГ-1.

Известно, что противовоспалительное лекарственное средство диклофенак является неселективным блокатором фермента циклооксигеназы (ЦОГ-1 и ЦОГ-2), тогда как препараты целебрекс ($C_{17}H_{14}F_3N_3O_2S$) и нимесулид (CAS 51803-78-2) селективно блокируют ЦОГ-2.

Удлинение лебетазного времени свертываемости плазмы крови ЭВМК под влиянием диклофенака и укорачивание при действии нимесулида свидетельствуют о том, что лебетазное время удлиняется при ингибировании продуктов ЦОГ-1 и умеренно укорачивается при действии селективных ингибиторов ЦОГ-2 нимесулида, целебрекса и плацебо.

Эти результаты подтверждают то, что гемокоагуляционные эффекты различных групп НПВС связаны с селективностью ингибирования циклооксигеназ (ЦОГ-1 и ЦОГ-2). Применение неселективных НПВС сопровождается антикоагулянтным и антиагрегаторным эффектом данных препаратов, связанных с угнетением тромбоксана - эндогенного соединения, способствующего агрегации тромбоцитов и образованию тромбов.

Таким образом, полученные результаты подтверждают возможности применения лебетазы, с помощью которой в различные сроки экспериментального внутримозгового кровоизлияния (ЭВМК) можно определить гомеостатическое состояние больных и применение определенных групп НПВС.

На основе полученных результатов исследования механизма действия фракций яда змей гюрзы *Vipera lebetina*, в частности лебетазы, разработан новый метод, позволяющий проводить диагностику нарушений функций сердечно-сосудистой системы, сроков, тяжести заболевания и рекомендовать применение НПВС, определенного класса.

Также, на основе фармакологического действия (противовоспалительное и обезболивающее действие) яда гюрзы и его компонентов, создана технология приготовления лекарственного препарата в виде мази. Противовоспалительное и обезболивающее действие этой мази связано с тормозящим действием на синтез и активность простагландинов и эйкозаноидов, являющихся основными медиаторами, определяющими возникновение, динамику и исход болевых и воспалительных синдромов.

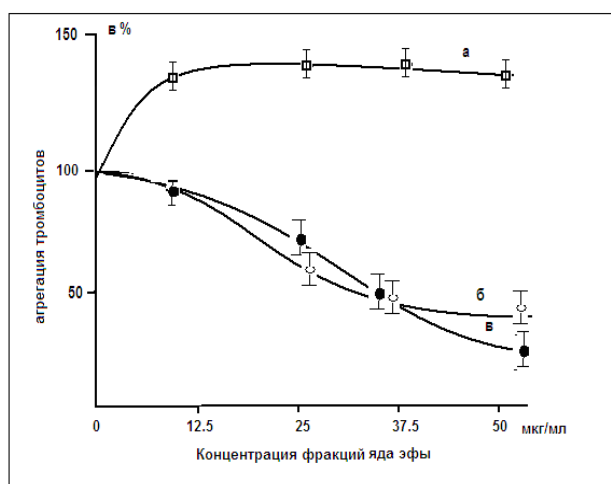
При исследовании действия другого змеиного яда эфы *Echis multisquamatus* установлено, что яд обладает прямым активирующим влиянием на протромбин (фактор II). В результате чего образуется изофермент тромбина. При этом процесс тромбообразования не нуждается в ионах кальция.

Из яда змей эфы методами гельфильтрации и ионообменной хроматографии на колонках с гелем Toyopearl TSK – HW 60 и с CM-Sephadex G-25 выделены гемотоксические фракции, специфически действующие на агрегацию тромбоцитов и разные этапы свертывающей системы крови. Из них следует выделить фракцию Ем-3-V, которая в концентрации (10 мкг/мл) и отсутствии ионов кальция в среде вызывает свертывание цитратной плазмы и агрегацию тромбоцитов подобно тромбину. Фракции Ем-3-III – Ем-3-IV проявляли прокоагулянтную активность при более высоких концентрациях (10-50 мкг/мл) и в присутствии ионов кальция.

При исследовании действия этих фракций на АДФ- и адреналин-индуцированную агрегацию тромбоцитов установлено, что фракция Ем-3-V в дозе 10 мкг/мл вызывает усиление агрегации тромбоцитов, а в присутствии ионов кальция вызывает образование нитей фибрина. Другие фракции Ем-4 и Ем-5 (полученные после гельфильтрации) в концентрации 10 мкг/мл в разной степени ингибировали агрегацию тромбоцитов (рис.9).

При исследовании токсичности полученных фракций установлено, что наиболее токсичной для мышей является фракция Ем-3-III (ЛД₅₀ для которой составляет $2,5 \pm 0,5$ мг/кг), обладающая прокоагулянтной активностью, тогда как фракции Ем-4 и Ем-5 (при первом разделении), ингибирующие агрегацию тромбоцитов, не проявляли токсичности в сравнительно больших дозах.

В целом, полученные данные свидетельствуют о том, что в яде эфы имеются компоненты, специфически действующие на свертывающую систему крови и агрегацию тромбоцитов. Фракция Ем-3 – протеаза с тромбиноподобной активностью, отличается от эндогенного тромбина тем, что она проявляет свою активность независимо от присутствия ионов кальция.



а - действие фракции Ем-3-V;
б, в - действие фракций Ем-4 и Ем-5
 $P < 0,05 (n = 5-8)$.

Рис. 9. Влияние фракций яда эфы на спонтанную и АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов.

Фракция Ем-4 - ингибитор агрегации тромбоцитов, обладает фосфолипазной А активностью, возможно её действие сопровождается ингибированием метаболизма арахидоновой кислоты, простагландинов и освобождением Ca^{2+} из внутриклеточных депо, что приводит к ингибированию агрегации тромбоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе с помощью хроматографических методов из ядов пауков *Argiope lobata*, *Anemesia sp.*, *Eresus niger*, *Allohona singorensis*, *A galena labirintica*, скорпионов *Mesobuthus caucasicus*, *Mesobuthus sp.*, змей гюрзы *Vipera lebetina*, эфы *Echis multisquamatus* выделены более 10 токсинов, специфически модифицирующих различные типы Ca^{2+} -каналов и рецепторов нервных и мышечных клеток и Ca^{2+} -зависимых процессов системы гемостаза.

Обнаруженные нами нейротоксины были использованы как инструменты исследования:

- процесса секреции медиатора и глутаматергических синапсов;
- особенностей функционирования Ca^{2+} -каналов пресинаптической мембраны позвоночных животных;
- молекулярного механизма функционирования ионных каналов, играющих ключевую роль возбудимых мембран;
- механизмов свертывания крови и системы гемостаза.

Методами радиолигандного анализа с помощью нейротоксинов яда паука *Argiope lobata* показано, что Mg^{2+} - связывающие и полиаминные участки управляют Ca^{2+} каналы и его десенситизации.

Выделены новые токсины - An4 и An5 из яда паука *Anemesia sp.*, которые избирательно взаимодействуют с функционально различными участками нервно-мышечных синапсов саранчи. С помощью этих токсинов показано, что амплитуда гигантских МВПСП прямо зависит от концентрации ионов Ca^{2+} .

Из яда пауков *A.labirintica* и *A.singoriensis* выделены нейротоксические компоненты, взаимодействующие как с потенциал-, так и рецептор-зависимыми Ca^{2+} -каналами.

Полученные результаты могут найти применение не только при фундаментальных исследованиях, но могут стать основой для создания новых диагностических и лекарственных препаратов. Существенным представляется и тот факт, что на основе компонента яда гюрзы - лебетазы уже разработан новый метод, позволяющий определять нарушения функций свертывания крови при сердечно-сосудистых заболеваниях. В основе метода лежит взаимодействие лебетазы с мембраносвязанным кальцием и тканевым тромбопластином (фактором III), который попадает в кровь из поврежденных тканей сосудов и обеспечивает активацию мембраны тромбоцитов и факторов свертывания. Это позволяет определить активацию факторов свертывания крови по внешнему пути, при нарушениях сосудисто-тромбоцитарного гемостаза.

Также на основе ингибирования продуктов ЦОГ-метаболизма арахидоновой кислоты, простагландинов и релаксантного действия сократительной активности кровяных сосудов, компонентов яда гюрзы разработана технология болеутоляющего и противовоспалительного лекарственного препарата в виде мази. Мазь предназначена для профилактики и лечения ревматических заболеваний, неспецифических и инфекционных полиартритов, заболеваний периферической нервной системы (радикулиты, ишалгия, миозиты), кровеносных сосудов и некоторых других заболеваний.

В результате проведенных исследований можно сделать следующие **основные выводы:**

1. В процессе исследования механизма нейро и гемотоксического действия фракций ядов животного происхождения обнаружены компоненты, специфически модифицирующие Ca^{2+} -каналы и рецепторы нервных и мышечных клеток, а также Ca^{2+} -зависимые процессы системы гемостаза.

2. Установлено, что компоненты яда паука *Argiope lobata* способны специфически взаимодействовать с разными участками глутаматного рецептора:

а) токсин A-V-2-1 (м.м. 637 Да) обладает свойством антагониста смешанного типа подобно глутамату и конкурентно взаимодействует с глутаматными участками NMDA-рецепторов;

б) аргиолобатин (м.м. 657 Да) в зависимости от концентрации проявляет двухфазный характер действия на связывание лигандов - [^3H]-глутамата и специфического антагониста NMDA-рецепторов [^3H]-МК-801 с фракцией синаптических мембран. Этот эффект обусловлен действием токсина, как минимум, на два участка Ca^{2+} -канала NMDA-рецепторов: низкоаффинным,

конкурируя с ионами Mg^{2+} и высокоаффинным полиаминным, управляющим ионным каналом и его десенситизацией.

3. Показано, что нейротоксические фракции (An4 ~ 13, An5 ~ 5 и An7 ~ 1 кДа), выделенные из яда паука *Anemesia sp.*, избирательно взаимодействуют с функционально различными участками пре- и постсинаптических мембран нервно-мышечного синапса саранчи. Установлена взаимосвязь между механизмами действия этих компонентов и их токсичностью.

4. Установлено, что фракция VIII-4 (м.м. ~14000 Да), выделенная из яда паука *Eresus niger*, обладает фосфолипазной активностью, подобно пресинаптическим токсинам змей и вызывает существенные нарушения Ca^{2+} -зависимых процессов и механизма секреции медиатора пресинаптических мембран нервных окончаний.

5. Из яда пауков *A. labirintica* и *A. singorensis* выделены модуляторы потенциал-зависимых и рецептор управляемых Ca^{2+} -каналов:

а) компонент Ag11 (м.м. 1000 Да) яда паука *A. labirintica* специфически блокирует Ca^{2+} -каналы пресинаптической мембраны нервно-мышечных синапсов лягушки;

б) нейротоксическая фракция As-1₃ (м.м. ~11000 Да) яда паука *A. singorensis* взаимодействует как с потенциал-, так и рецептор-зависимыми Ca^{2+} -каналами гладкомышечных клеток.

6. Из яда скорпионов *Mesobuthus caucasicus* и *Mesobuthus sp.* выделены инсектотоксины McITX1 ~3, McITX3 ~3 кДа, McITX2 ~7 кДа и Msp₍₅₋₈₎-VI-13 ~3, Msp₍₅₋₈₎-XVII-4 ~3, Msp₍₅₋₈₎-XII-5 ~3 кДа с высокой избирательностью для насекомых разных систематических групп. Токсины McITX1 и McITX3 в концентрациях 0,1-0,5 мкг/мл вызывают деполяризацию мембранного потенциала, и блокируют синаптическую передачу нервно-мышечных препаратов таракана. Токсины McITX2 и Msp₍₅₋₈₎ - XII-5 увеличивают частоту миниатюрных потенциалов, сопровождающихся медленной и слабой деполяризацией мембранного потенциала.

7. Из яда змей эфы *Echis multisquamatus* выделены гемотоксические фракции, специфически действующие на агрегацию тромбоцитов и на разные этапы свертывающей системы крови. Из них фракция Em-3-V вызывает свертывание цитратной плазмы и агрегацию тромбоцитов в отсутствии ионов Ca^{2+} в среде.

8. Установлено, что действие лебетазы (м.м. ~29 кДа), выделенной из яда гюрзы *Vipera lebetina*, связано с ее влиянием как на начальные стадии свертывания - процесса тромбопластинообразования, так и на процессы формирования фибринового сгустка. В основе действия лебетазы на процесс тромбопластинообразования лежит её взаимодействие с мембраносвязанным Ca^{2+} и тканевым тромбопластином (фактором III), которые попадают в кровь из поврежденных тканей сосудов и активируют плазменные факторы, подобно комплексу (тканевой фактор-фактор VII) превращает фактор X в сериновую протеиназу фактор Ха и образования протромбиназы. Это

позволяет определить активации внешних факторов свертывания крови при нарушениях сосудисто-тромбоцитарного гемостаза.

На основе яда змей гюрзы *Vipera lebetina* и их фракций разработан болеутоляющей и противовоспалительной лекарственный препарат в виде мази. Создан диагностический метод, определяющий активацию тканевого фактора III (внешнего пути свертывания крови), который проявляется при нарушении функции сосудистого гемостаза.

Список опубликованных работ
Статьи, опубликованные в научных журналах

1. Усманов П.Б., Каликулов Д., Ненилин А.В., Насиров К.Э., Ахмедов К.Д., Ташмухамедов Б.А. Действие яда паука *Eresus niger* на нервно-мышечные синапсы лягушки // Биологические науки. – Москва, 1988. – № 11. С. 20-23.
2. Атакузиев Б.У., Насиров К.Э., Каликулов Д., Усманов П.Б. Блокаторы глутаматных рецепторов из яда пауков *Argiope lobata* и *Araneus tartaricus* // Химия природных соединений. – Ташкент, 1990. – № 4. - С. 532-537.
3. Усманов П.Б., Каликулов Д., Насиров К.Э., Ахмедов К.Д., Нуртаев Х.С. Новые нейротоксические компоненты яда паука *Argiope lobata* // Биологические мембраны. – Москва, 1991. - Т.8. - № 11.- С.1135-1136.
4. Усманов П.Б., Каликулов Д., Насиров К.Э., Ахмедов К.Д., Нуртаев Х.С. Действие аргиолобатина на L-глутамат-активируемые токи мышц саранчи // Биологические мембраны. – Москва, 1992. - Т.9. - № 10.- С.1142-1143.
5. Насиров К.Э., Каликулов Д., Ахмедов К.Д., Усманов П.Б. Выделение блокатора Са-каналов из яда паука *Agelena labirintica* // Химия природных соединений. – Ташкент, 1995. – № 3. - С. 467-470.
6. Каликулов Д., Насиров К.Э., Ахмедов К.Д., Усманов П.Б. Выделение и характеристика нейротоксинов яда паука *Anemesia sp.* // Химия природных соединений. – Ташкент, 1995. – № 3. –С. 471-473.
7. Насиров К.Э., Усманов П.Б. Выделение и физико-химическая характеристика ингибитора агрегации тромбоцитов из яда гюрзы *Vipera lebetina* // Химия природных соединений. – Ташкент, 1999. – Спец. выпуск. - С. 186-187.
8. Онгарбоев А.Б., Насиров К.Э., Усманов П.Б. Влияние токсинов из яда паука *Argiope lobata* на рецепторное связывание [³H]-глутамата с синаптическими мембранами из гиппокампа крыс // Химия природных соединений. – Ташкент, 1999. – Спец. выпуск. - С.189-191.
9. Насиров К.Э., Ибодуллаев О.Н., Усманов П.Б. Влияние яда гюрзы *Vipera lebetina turanica* на внутриклеточную активацию Са²⁺ в тромбоцитах // Химия природных соединений. – Ташкент, 2001. – Спец. выпуск. - С.107.
10. Насиров К.Э., Ибодуллаев О.Н., Каликулов Д., Атакузиев Б.У., Усманов П.Б. Выделение активатора Са²⁺-каналов из яда тарантула *A.singorensis*, // Химия природных соединений.– Ташкент, 2002. – Спец. выпуск. – С.104-105.
11. Есимбетов А.Т., Насиров К.Э., Джолдасова К.Б., Усманов П.Б., Рахимов Ш.Б., Салимов Б. Действие растительных алкалоидов гермерина, зеравшанизина и N-бензильного производного цитизина (Ц-2Br-ИБ) на сократительную активность гладкомышечных клеток аорты крысы // Узбекский биологический журнал. –Ташкент, 2005. – №1. - С. 24-27.

12. Есимбетов А.Т., Насыров К.Э., Усманов П.Б., Набиев А. Влияние алкалоида криптопина на сократительную активность гладкомышечных клеток аорты крысы // Химия и фармация. - Ташкент, 2005. - №6.- С.66-68.
13. Есимбетов А.Т., Насиров К.Э., Усманов П.Б., Салимов Б.Т. Эндотелийзависимое релаксантное действие растительного алкалоида зеравшанизина // Вестник ККО АН РУз. – Нукус, 2005. - №5. - С. 11-13.
14. Насиров К.Э., Асраров М.И., Усманов П.Б., Зиявутдинов Д. Ф., Сагдиев Н.Ж. Выделение и токсикологическая характеристика инсектотоксинов из яда скорпиона *Mesobuthus sp.* // Узбекский биологический журнал. – Ташкент, 2007. – № 1. - С. 7-10.
15. Насиров К.Э., Асраров М.И., Усманов П.Б., Зиявутдинов Д. Ф., Сагдиев Н.Ж. Выделение и характеристика инсектотоксинов из яда скорпиона *Mesobuthus caucasicus*. // Доклады Академии наук РУз. –Ташкент, 2007. – № 5.- С. 67-69.
16. Насиров К.Э., Есимбетов А.Т. Исследование влияния фракций яда гюрзы *Vipera lebetina* на динамику свертывания крови крыс при различных формах инсульта // Вестник ККО АН РУз.- Нукус, 2007. – № 3. -С.27-32
17. Джолдасова К.Б., Чернова Л.А., Наджимова Х.К., Насиров К.Э. Действие фракции Г-IV-2 яда гюрзы *V. lebetina* на агрегацию тромбоцитов и перераспределение в них внутриклеточного Ca^{2+} // Узбекский биологический журнал. – Ташкент, 2008. – № 6. - С.12-15.
18. Наджимова Х.К., Насиров К.Э., Джолдасова К.Б., Чернова Л.А. Влияние фракций яда гюрзы *Vipera lebetina* на известные тесты гемостаза в норме и патологии // Узбекский биологический журнал. – Ташкент, 2009. – №1.- С.12-14.
19. Насиров К.Э., Чернова Л.А., Усманов П.Б. Действие фракций яда гюрзы *V.lebetina* на процесс тромбопластинообразования // Узбекский биологический журнал. – Ташкент, 2010. – №1.- С.16-19.
20. Насиров К.Э., Чернова Л.А., Усманов П.Б. Диагностика нарушений системы свертывания крови с помощью змеиных ядов семейства *Viperidae* // Узбекский биологический журнал. – Ташкент, спец.выпуск- С.69-75.

Авторские свидетельства и патенты

21. Усманов П.Б., Миралимов М.М., Насиров К.Э. и др. Способ получения мази, содержащей яд. Патент № 3333 от 03.01.1995. Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Республики Узбекистан 26.03.1995.
22. Усманов П.Б., Миралимов М.М., Насиров К.Э. и др. Мазь на основе яда гюрзы. Патент № 3337 от 03.01.1995. Загистрировано в Государственном реестре изобретений Республики Узбекистан 26.03.1995.

Статьи, опубликованные в сборниках научных трудов, тезисы, препринты, рефераты, информации и аннотации

23. Усманов П.Б., Каликулов Д., Ненилин А.В., Насиров К.Э., Ахмедов К.Д., Ташмухамедов Б.А. Действие яда паука *Eresus niger* на нервно-мышечные синапсы лягушки // IV Всесоюз. Физиологического общества им. И.П.Павлова. – Кишинев, 1987. - С. 198.

24. Насиров К.Э. Блокаторы глутаматного рецептора // Тез. докл. науч.конф. к 50-летию АН РУз, Ташкент. - 1993. – С. 76.

25. Насиров К.Э., Ахмедов К.Д., Каликулов Д., Усманов П.Б. Модификаторы кальциевых каналов пресинаптической мембраны из ядов пауков *Anemesia sp.* и *Agelena labirintica* // Структура и функции биологических мембран: Тез. докл. науч. конф. – Ташкент, 1995. – С. 26.

26. Насиров К.Э., Усманов П.Б., Калмыкова И.Б., Нуритова Ф.А. Действие фракции яда гюрзы *Vipera lebetina* на систему свертывания крови // Структура и функции биологических мембран: Тез. докл. науч. конф. – Ташкент, 1995. – С. 90.

27. Насиров К.Э., Усманов П.Б., Нуритова Ф.А., Калмыкова И.Б. Действие фракции яда эфы *Echis multisquamatus* на агрегацию тромбоцитов// Структура и функции биологических мембран: Тез. докл. науч. конф. – Ташкент, 1995. – С. 92.

28. Каликулов Д., Насиров К.Э., Усманов П.Б. Использование радиолигандов при изучении молекулярной организации биологических мембран // Радиоизотопы и их использование: Тез. науч. конф. – Ташкент, 1995. – С. 38.

29. Каликулов Д., Насиров К.Э., Усманов П.Б. Действие низкомолекулярных компонентов яда паука *Anemesia sp.* на нервно-мышечные синапсы саранчи // IX Международное совещание по эволюционной физиологии: Тез. докл. – Санкт-Петербург, 1996. – С. 196.

30. Насыров К.Э., Чечулина М.В., Усманов П.Б. Влияние яда гюрзы (*Vipera lebetina turanica*) на агрегацию тромбоцитов и на транспорт ионов кальция через мембраны тромбоцитов // Тез. докл. Межд.симп. -Алма-ата, 2000. - С.97.

31. Насиров К.Э., Чечулина М.В., Калмыкова И.Б. Действие фракции яда гюрзы *Vipera lebetina* на функциональную активность тромбоцитов // Структура и функции биологических мембран: Тез. докл. науч. конф. посвященной 10-летней годовщине независимости Республики Узбекистан, 17-18 мая 2001. – Ташкент, 2001. – С.34-35.

32. Насиров К.Э., Чечулина М.В. Исследование механизма действия яда гюрзы *Vipera lebetina* на агрегацию тромбоцитов // Структура и функции биологических мембран: Тез. докл. науч. конф. посвященной 10-летней годовщине независимости Республики Узбекистан, 17-18 мая 2001. – Ташкент, 2001. – С.35-36.

33. Chernova L.A., Nasirov K.E., Chechulina M.V., Usmanov P.B., Sirov V.N., Hushbakhtova Z. A. Effects of some plant alkaloids on specific binding of 3H-hitrendipine to rat brain membranes// The third conference «Radioisotopes and There applications» - Tashkent, 8-10 october 2002. – P. 37.

34. Nasirov K. E., Chernova L.A., Usmanov P.B. Effect of Argiobolatin on the binding of [³H]–nitrendipine to rat brain membranes // 5th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds, May 20-23, 2003. – Tashkent, 2003. – P.214.

35. Chernova L.A., Nasirov K. E., Usmanov P.B Polyamine-like effects of AV-7-7 spider toxin on nmda receptors// 5th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds, May 20-23, 2003. – Tashkent, 2003. – P. 286.

36. Насиров К.Э., Чернова Л., Маматкадиров К., Атакузиёв Б.У., Усманов П.Б. Выделение и характеристика модификатора Ca^{2+} -канала из яда паука тарантула *L. singorensis* // Биология – наука XXI века: Тез. докл. Пушинской школы конференции молодых ученых. – Пушкино, 2004. -С. 218.

37. Мусаева Ю.А., Саидвалиев Ф.С., Насиров К.Э. Некоторые коагуляционные показатели при экспериментальном ишемическом инсульте. // Современные проблемы физиологии и биофизики: Тез. науч. конф. 14-15 октября 2004. – Ташкент, 2004. – С. 40.

38. Насиров К.Э. Исследование компонентов яда эфы *Echis multisquamatus* на гемокоагуляционный потенциал // Современные проблемы физиологии и биофизики: Тез. науч. конф. 14-15 октября 2004. – Ташкент, 2004. – С. 45-46.

39. Насиров К.Э., Есимбетов А.Т., Усманов П.Б. Действие яда гюрзы *Vepra Lebentina Turanica* на Ca^{2+} -гомеостаз в тромбоцитах // Механизмы функционирования висцеральных систем: Тез. докл. III Всероссийской конф. с Международным участием, посвященной 175-летию со дня рождения Ф.В.Овсянникова. – Санкт-Петербург, 2003. – С. 214-215.

40. Насиров К.Э., Есимбетов А.Т., Усманов П.Б. Регуляция функционального состояния тромбоцитов с помощью фракций яда гюрзы *Vepra lebentina Turanica* // Механизмы функционирования висцеральных систем: Тез. докл. III Всероссийской конф. с Международным участием, посвященной 175-летию со дня рождения Ф.В.Овсянникова. – Санкт-Петербург, 2003. – С. 215.

41. Насиров К.Э., Есимбетов А.Т., Усманов П.Б., Шокиров Р.Ш. Действие некоторых алкалоидов на агрегационную активность тромбоцитов // Тез. XIX съезда физиологического общества им. И.П.Павлова. Екатеринбург (Россия), 2004. - С. 58-59.

42. Есимбетов А.Т., Насиров К.Э., Усманов П.Б., Рахимов Ш.Б. Эффекты алкалоида Ц-2-Вг-ИВ на сократительную активность ГМК воротной вены крыс // IV Всероссийская конференция с Международным участием, посвященная 80-летию Института физиологии им. И.П.Павлова РАН. -Санкт-Петербург, 2005. - С.92-93.

43. Насиров К.Э., Есимбетов А.Т., Усманов П.Б. Исследование действия СМП, выделенных из крови больных ишемическим инсультом на свертываемость плазмы крови и уровень внутри-клеточного Ca^{2+} в тромбоцитах // II Всероссийская конференция по клинической гемостазиологии и гемореологии в сердечно-сосудистой хирургии. - Москва, 2005. - С. 91.
44. Чернова Л.А., Наджимова Х.К., Насиров К.Э. Действие различных фракций яда гюрзы на время образования растворимых фибрин-мономеров // Современные проблемы физиологии и биофизики: Тез. докл. Респ. науч. конф. 24-25 октября 2007 – Ташкент, 2007. – С. 153-154.
45. Насиров К.Э. Действие фракции G-III-2 яда гюрзы *Vipera lebetina* на процесс тромбопластинообразования // Современные проблемы физиологии и биофизики: Тез. докл. Респ. науч. конф. 24-25 октября 2007 – Ташкент, 2007. – С. 94-95.
46. Насиров К.Э. Действие фракции G-III-2 яда гюрзы *Vipera lebetina* на плазму крови больных ишемическим инсультом // Современные проблемы физиологии и биофизики: Тез. докл. Респ. науч. конф. 24-25 октября 2007 – Ташкент, 2007. – С.92-93.
47. Насиров К.Э., Саидвалиев Ф.С., Есимбетов А.Т. Действия ядов гюрзы *Vipera lebetina* и эфы *Echis multisquamatus* на плазму крови больных сердечно сосудистой системы // Современные проблемы физиологии и биофизики: Тез. докл. Респ. науч. конф. 24-25 октября 2007 – Ташкент, 2007. – С. 89-90.
48. Наджимова Х.К., Чернова Л.А., Насиров К.Э. Влияние различных фракций яда гюрзы *Vipera lebetina* на АЧТВ-тест // Современные проблемы физиологии и биофизики: Тез. докл. Респ. науч. конф. 24-25 октября 2007 – Ташкент, 2007. – С. 93-94.
49. Nasirov K.E. Influence of the fraction G-III-2 from *Vipera lebetina turanica* snake venoms on intracellular activation Ca^{2+} in platelets // 9th Pan-American Section Congress of the IST, October 21st - 25th. – Juriquilla, Querétaro, México, 2008 P.95.
50. К.Э.Насиров, Л.А.Чернова, П.Б.Усманов. Распознавание нарушения гемостаза при сердечно-сосудистых заболеваниях с помощью лебетазы // Актуальные проблемы химии природных соединений: Тез. конф. 18-19 марта 2009. – Ташкент, 2009. – С. 179.

РЕЗЮМЕ

диссертации Насирова Кабила Эркиновича на тему: «Сравнительное исследование механизмов нейро- и гемотоксического действия компонентов ядов животного происхождения» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.13 - Физиология человека и животных.

Ключевые слова: токсичность, нейротоксины, ионные каналы, рецепторы, Ca^{2+} -зависимые процессы, гемотоксины, коагулянты.

Объект исследования: яды животных и их компоненты.

Цель работы: исследовать механизм токсикологического действия некоторых ядов животных и их компонентов на нервные и мышечные клетки кровеносных сосудов и активацию гемостаза. На основе полученных результатов разработать рекомендации по созданию лекарственных и диагностических препаратов.

Методы исследования: в работе применены биофизические, биохимические и физиологические методы исследования.

Полученные результаты и их новизна: в процессе исследования особенностей механизмов нейро- и гемотоксического действия различных ядов пауков *Argiope lobata*, *Anemesia sp.*, *Eresus niger*, *Agelena labirintica*, *Allohona singorensis*, скорпионов *Mesobuthus caucasicus* и *Mesobuthus sp.*, а также змей эфы *Echis multisquamatus* и гюрзы *Vipera lebetina* обнаружены и выделены нейро- и гемотоксины, специфически модифицирующие различные типы Ca^{2+} -каналов и рецепторов клеток кровеносных сосудов и активацию Ca^{2+} -зависимых процессов системы гемостаза.

Практическая значимость: полученные данные представляют, прежде всего, фундаментальный интерес, поскольку использование компонентов ядов животных в качестве инструментов позволяет существенно расширить представления о механизмах функционирования и организации глутаматных рецепторов, сократительной активности ГМК, активации гемостаза, а также особенности организации модуляции кальциевого гомеостаза и связанных с ним транспортных систем различных клеток. Кроме того, эти результаты найдут применение не только при установлении нарушений молекулярных механизмов функционирования сердечно-сосудистой и системы гемостаза, но и могут быть использованы в клинической практике для регуляции процесса гемостаза при тромботических и геморрагических осложнениях.

Степень внедрения и экономическая эффективность: на основе полученных результатов разработана технология производства болеутоляющей и противовоспалительной мази и создан диагностический метод, определяющий активацию тканевого фактора III (внешнего пути свертывания крови), который проявляется при нарушении функции сосудистого гемостаза.

Область применения: физиология, биофизика, фармакология, здравоохранение.

Биология фанлари доктори илмий даражасига талабгор Носиров Кобил Эркиновичнинг 03.00.13 - одам ва ҳайвонлар физиологияси ихтисослиги бўйича «Ҳайвон заҳарлари компонентларининг нейро- ва гемотоксик таъсир механизмларини қиёсий тадқиқ қилиш» мавзусидаги диссертациясининг

РЕЗЮМЕ СИ

Таянч (энг муҳим) сўзлар: токсиклик, нейротоксинлар, ион каналлари, рецепторлар, Ca^{2+} га боғлиқ жараёнлар, гемотоксинлар, коагулянтлар.

Тадқиқот объектлари: ҳайвон заҳарлари ва уларнинг компонентлари.

Ишнинг мақсади: айрим ҳайвонларнинг заҳарлари ва компонентларининг қон томирлари нерв-мускул хужайралари ва гемостаз активациясига таъсир механизмининг токсикологик хусусиятини ўрганиш.

Тадқиқот усуллари: биофизикавий, биокимёвий, физиологик тадқиқот методлари.

Олинган натижалар ва уларнинг янгилиги: *Argiope lobata*, *Anemesia sp.*, *Eresus niger*, *Agelena labirintica*, *Allohona singorensis* ўргимчаклари, *Mesobuthus caucasicus*, *Mesobuthus sp.* чаёнлари, ҳамда *Vipera lebetina* гюрза илони ва *Echis multisquamatus* чархилони заҳарларининг нейро- ва гемотоксик таъсир механизмлари хусусиятларини тадқиқ қилиш жараёнида қон-томирлари хужайраларидаги турли типдаги Ca^{2+} -каналлари ва рецепторларни ўзига хос равишда модификацияловчи ва гемостаз системасининг Ca^{2+} га боғлиқ жараёнларни фаоллаштирувчи нейро- ва гемотоксинлар аниқланди ва ажратиб олинди.

Амалий аҳамияти: олинган натижалар асосан фундаментал характерга эгадир, чунки ҳайвонлар заҳарлари компонентларидан тадқиқот инструментлар сифатида фойдаланиш орқали глутамат рецепторларининг фаолият кўрсатиши ва тузилишининг механизмлари, силиқ мускул хужайраларнинг қисқариш фаоллиги, ҳамда кальций гомеостази модуляциясининг тузилиш хусусиятлари ва улар билан боғлиқ бўлган турли хужайралардаги транспорт системалари тўғрисидаги тушунчалар кенгаяди. Ундан ташқари, ушбу натижалар нафақат юрак қон-томир ва гемостаз системасининг фаолият кўрсатишининг молекуляр механизмларидаги бузилишларни аниқлаш, балки клиник амалиётда ҳозирги вақтда бутун дунёда кенг тарқалган тромботик ва геморрагик асоратларда гемостаз жараёнини ўрганишда қўлланилиши мумкин.

Татбиқ этиш даражаси ва иқтисодий самарадорлиги: олинган натижалар асосида оғриқ қолдирувчи ва яллиғланишга қарши малҳам ишлаб чиқариш технологияси яратилди ва томир гемостази функциясини бузилишида содир бўладиган тўқима фактори III (қон ивишининг ташқи йўли)нинг фаоллашувини аниқлаб берувчи диагностик метод яратилди.

Қўлланиш (фойдаланиш) соҳаси: физиология, биофизика, фармакология, соғлиқни сақлаш.

RESUME

Thesis of Nasirov Kabil Erkinovich on the scientific degree competition of the Doctor of Sciences in biology on specialty 03.00.13 Human and Animal Physiology, subject: "A comparative study of the mechanism of neuro- and hemotoxic effect of the components of animal venoms"

Key words: toxicity, neurotoxins, ion canals, receptors, Ca^{2+} -dependent processes, hemotoxins, coagulants.

Subjects of research: animal venoms and their components.

Purpose of work: the study of toxicological peculiarities of the mechanism of effect of some animal venoms and their components on the nerve-muscle cells of blood vessels and activation of hemostasis; elaboration of recommendations on the development of medicinal and diagnostic preparations on the basis of obtained data.

Methods of research: biophysical, biochemical, as well as physiological methods of study.

The results obtained and their novelty: during the study of the peculiarities of the mechanism of neuro- and hemotoxic effects of different venoms of spiders *Argiope lobata*, *Anemesia sp.*, *Eresus niger*, *Agelena labrintina*, *Ilohona singoriensis*, scorpions *Mesobuthus caucasicus* and *Mesobuthus sp.*, as well as the snakes *Echis multisquamatus* and *Vipera lebetina* we discovered and isolated neuro- and hemotoxins specifically modifying different types of Ca^{2+} canals and receptors of blood-vessel cells, and activation of Ca^{2+} dependent processes of the hemostasis system.

Practical value: obtained data are, first and foremost, of fundamental interest since the use of components of animal venoms as instruments enables a significant expansion of the knowledge of mechanisms of functioning and organization of glutamate receptors, contractive activity of the smooth muscle cells, activation of hemostasis, as well as peculiarities of the organization of the modulation of the calcium homeostasis and related transport systems of various cells. Besides, these results will be applied not only at the establishment of disturbances of molecular mechanisms of the functioning of the cardiac-vascular and homeostasis systems, but also can be applied in the clinical practice for the regulation of the process of hemostasis at thrombotic and hemorrhagic complications widely spread all over the world.

Degree of embed and economic effectivity: a technology of production of the analgesic and anti-inflammatory ointment is developed based on data obtained, as is the diagnostic method determining the activation of the tissue factor III (external way of blood coagulation), which is manifested at the violation of the function of the vascular hemostasis.

Field of application: physiology, biophysics, pharmacology, public health.

