IQRO JURNALI , IQRO JOURNAL, ИКРО ЖУРНАЛИ
ISSN:2181-4341| wordlyknowledge.uz/index.php/iqro
Volume 24. Issue 01. Oktabr, 2026

UDK: 577.12; 577.127.4

G‘URZA (VIPERA LEBETINA TURANICA) ZAHARI PROTEOLITIK KOMPLEKSINING FIBRINO(GENO)LITIK VA TROMBOLITIK FAOLLIGI

R.M. Kuranboyeva
K.A. Sodiqova
Mirzo Ulug‘bek nomidagi O‘zbekiston Milliy universiteti, Toshkent, O‘zbekiston
https://doi.org/10.5281/zenodo.23269693

Annotatsiya. Maqolada g‘urza (Vipera lebetina turanica) zahari proteolitik kompleksining fibrino(geno)litik va trombolitik faolligi eksperimental o‘rganilgan. Zahar Sephacryl S-200 va Superose-12 gel-filtratsiyasi yordamida fraksiyalarga ajratildi; fraksiyalarda BAEE-esteraza (ΔA253) va L-aminokislota oksidaza (ΔA436) faolliklari aniqlandi. Fibrinolitik faollik fibrin plastinkalari testida, fibrinogenolitik faollik esa inson fibrinogeni (1 %) bilan 3 soatlik inkubatsiyadan so‘ng 10 % DSN-PAAG elektroforezida baholandi. Butun zahar 50 va 25 mkg dozalarda fibrinni faol parchalagan (lizis zonalari mos ravishda 324,0 va 341,1 mm²). Sephacryl S-200 orqali olingan fraksiyalar ichida eng yuqori fibrinolitik faollik III-1 fraksiyasida qayd etildi; 1-fraksiya (60–94 kDa) asosan L-aminokislota oksidaza, 2-fraksiya (14–32 kDa) esa BAEE-esteraza va fosfolipaza faolligi bilan tavsiflandi. Molekulyar massasi ≥76–43 kDa bo‘lgan fraksiyalar fibrinogenning avvalo Aα, so‘ngra Bβ zanjirini, ≤43–25 kDa bo‘lgan fraksiyalar esa asosan Bβ zanjirini gidrolizlagan; γ-zanjir barcha hollarda saqlanib qolgan. Donor qonidan hosil qilingan trombda 24 soatlik inkubatsiyada nam tromb massasi nazoratdagi 274,8±5,6 mg dan 500 va 1000 mkg/tromb dozalarda mos ravishda 214,7±2,8 va 190,22±9,15 mg gacha, 48 soatda esa nazoratdagi 260,9±5,6 mg dan 158,22±4,52 va 120,85±4,95 mg gacha kamaygan ($p<0,05$). III-1 fraksiyasi yuqori fibrinolitik va nisbatan past gemorragik faollikni birlashtirgani sababli gemorragik bo‘lmagan fibrinogenazalarni ajratish uchun istiqbolli boshlang‘ich material hisoblanadi.

Kalit so‘zlar: Vipera lebetina turanica, ilon zahari, proteolitik kompleks, fibrinogenaza, fibrinoliz, tromboliz, DSN-PAAG, gel-filtratsiya, gemostaz.

Аннотация. В статье экспериментально изучена фибрино(гено)литическая и тромболитическая активность протеолитического комплекса яда гюрзы (Vipera lebetina turanica). Яд разделён гель-фильтрацией на Sephacryl S-200 и Superose-12; во фракциях определены BAEE-эстеразная (ΔA253) и L-аминокислотоксидазная (ΔA436) активности. Фибринолитическую активность оценивали методом фибриновых пластин, фибриногенолитическую — электрофорезом в 10 % ДСН-ПААГ после 3-часовой инкубации с 1 % фибриногеном человека. Наибольшая фибринолитическая активность отмечена у фракции III-1. Фракции с молекулярной массой ≥76–43 кДа гидролизовали сначала Aα-, затем Bβ-цепь фибриногена, фракции ≤43–25 кДа — преимущественно Bβ-цепь; γ-цепь сохранялась. На тромбах из донорской крови масса влажного тромба за 24 ч

снижалась с 274,8±5,6 мг до 214,7±2,8 и 190,22±9,15 мг при дозах 500 и 1000 мкг/тромб, за 48 ч — с 260,9±5,6 мг до 158,22±4,52 и 120,85±4,95 мг ($p<0,05$).

Ключевые слова: Vipera lebetina turanica, яд змей, протеолитический комплекс, фибриногеназа, фибринолиз, тромболизис, ДСН-ПААГ, гель-фильтрация, гемостаз.

Abstract. The fibrino(geno)lytic and thrombolytic activity of the proteolytic complex of blunt-nosed viper (Vipera lebetina turanica) venom was studied experimentally. The venom was fractionated by gel filtration on Sephacryl S-200 and Superose-12; BAEE-esterase (ΔA253) and L-amino acid oxidase (ΔA436) activities were determined in the fractions. Fibrinolytic activity was assessed by the fibrin plate assay, and fibrinogenolytic activity by 10 % SDS-PAGE after 3 h incubation with 1 % human fibrinogen. The highest fibrinolytic activity was found in fraction III-1. Fractions of ≥76–43 kDa hydrolysed the Aα chain of fibrinogen first and then the Bβ chain, whereas fractions of ≤43–25 kDa degraded mainly the Bβ chain; the γ chain remained intact. In thrombi obtained from donor blood, the wet thrombus mass decreased after 24 h from 274.8±5.6 mg to 214.7±2.8 and 190.22±9.15 mg at doses of 500 and 1000 μg/thrombus, and after 48 h from 260.9±5.6 mg to 158.22±4.52 and 120.85±4.95 mg ($p<0.05$).

Keywords: Vipera lebetina turanica, snake venom, proteolytic complex, fibrinogenase, fibrinolysis, thrombolysis, SDS-PAGE, gel filtration, haemostasis.

Kirish

Yurak-qon tomir kasalliklari, jumladan tromboz bilan bog‘liq patologiyalar dunyo bo‘yicha o‘lim sabablari orasida yetakchi o‘rinni egallaydi. Tromboz jarayonida qon tomir ichida fibrin to‘ri va qon hujayralari to‘planib, mahalliy qon aylanishini buzadi. Hozirgi kunda qo‘llanilayotgan trombolitik preparatlar yuqori narxi, qon ketish xavfi va trombning qayta hosil bo‘lishi (reokklyuziya) kabi cheklovlarga ega. Shu sababli yangi, samarali va nisbatan xavfsiz fibrinolitik vositalar izlash dolzarb masala bo‘lib qolmoqda [5, 9].

Ilon zahari ko‘plab fermentlar va peptidlarni o‘z ichiga olgan murakkab biologik aralashma bo‘lib, uning proteolitik komponentlari gemostaz tizimiga bevosita ta’sir ko‘rsatadi [1, 4]. Bu fermentlar ikki asosiy guruhga bo‘linadi: metalloproteinazalar (SVMP) va serin proteazalar (SVSP). Metalloproteinazalar Zn^{2+} ga bog‘liq bo‘lib, ularning bir qismi fibrin va fibrinogenni plazminogenni faollashtirmasdan, bevosita parchalaydi [2, 3]. Aynan shu xususiyat ularni trombolitik vosita sifatida istiqbolli qiladi, chunki bunday fermentlar organizmning o‘z fibrinolitik tizimiga bog‘liq bo‘lmaydi.

Vipera lebetina zaharidan bir nechta fibrinolitik ferment ajratilgan. Ulardan eng yaxshi o‘rganilgani — lebetaza bo‘lib, u bevosita ta’sir etuvchi metalloproteinaza hisoblanadi [6, 7, 8]. Shuningdek, bu zahardan fibrinogenni parchalovchi va trombolitik faollik namoyon etuvchi fibrinogenazalar ham olingan [10]. Shunga qaramay, O‘zbekistonda tarqalgan Vipera lebetina turanica kenja turi zaharining proteolitik kompleksi, undagi fibrinogenazalarning soni, substrat spetsifikligi hamda gemorragik faollik bilan fibrinolitik faollik o‘rtasidagi nisbat yetarlicha o‘rganilmagan.

Mazkur ishning maqsadi — g‘urza (Vipera lebetina turanica) zaharining proteolitik kompleksini xromatografik usullar bilan ajratish hamda olingan fraksiyalarning fibrinogenolitik va trombolitik faolligini qiyosiy baholashdan iborat.

Materiallar va usullar

Tadqiqot obyekti. Tadqiqotda O‘zbekiston hududida tarqalgan g‘urza (Vipera lebetina turanica) ilonidan olingan liofillangan zahar ishlatildi. Zahar tajribadan oldin tegishli buferda eritilib, eritilmagan zarrachalardan tozalandi.

Zaharni fraksiyalash. Zahar dastlab Sephacryl S-200 kolonkasida gel-filtratsiya usuli bilan ajratildi; natijada to‘rtta asosiy oqsil piki (I–IV) olindi. Ajratishni davomiy nazorat qilish uchun elyuatda 280 nm dagi optik zichlik (A280) o‘lchandi. Keyingi bosqichda zahar Superose-12 kolonkasida (FPLC) qayta fraksiyalandi va to‘rtta asosiy pik olindi. Qiyoslash maqsadida Sephadex G-100 (kolonka 2,8×120 sm; elyuent 0,2 M NH_4Ac, pH 6,8) da ajratish ham o‘tkazildi.

Ferment faolliklarini aniqlash. BAEE-esteraza faolligi N-benzoil-L-arginin etil efiri substrati bo‘yicha 253 nm dagi optik zichlikning o‘zgarishi (ΔA253), L-aminokislota oksidaza faolligi esa 436 nm dagi o‘zgarish (ΔA436) orqali spektrofotometrik usulda baholandi.

Fibrinolitik faollik. Fibrinolitik faollik fibrin plastinkalari usulida aniqlandi. Plastinkalarga 50 va 25 mkg miqdorda butun zahar hamda 50 mkg miqdorda Sephacryl S-200 orqali olingan 1-, 2- va III-1 fraksiyalari qo‘yildi. Musbat nazorat sifatida tripsin, manfiy nazorat sifatida fiziologik eritma ishlatildi. Lizis zonasining yuzasi mm^2 da o‘lchandi.

Fibrinogenolitik faollik. Inson fibrinogeni (1 %) tekshirilayotgan fraksiyalar bilan 37 °C da 3 soat inkubatsiya qilindi. Reaksiya mahsulotlari Laemmli usuli bo‘yicha denaturatsiyalovchi sharoitda 10 % DSN-PAAG elektroforezida ajratildi [11]. Fibrinogenning Aα, Bβ va γ zanjirlari bantlarining parchalanish darajasi nazorat namunalar bilan solishtirib, densitometrik tahlil orqali baholandi.

Trombolitik faollik. Donor qonidan spontan hosil qilingan tromblar ishlatildi. Tromblar zaharning 500 va 1000 mkg/tromb dozalari bilan 24 va 48 soat davomida inkubatsiya qilindi. Har bir muddat oxirida nam tromb massasi o‘lchanib, nazorat guruhi bilan solishtirildi.

Gemorragik faollik. III-1 fraksiyasining gemorragik faolligi 0,07; 0,14 va 0,28 mg/kg dozalarda baholandi; har bir doza uchun 5 ta parallel o‘lchov o‘tkazildi.

Statistik tahlil. Tajribalar uch takrorlikda (n=3) o‘tkazildi. Natijalar o‘rtacha arifmetik qiymat va standart og‘ish (M±SD) ko‘rinishida keltirildi. Guruhlararo farqlar Student t-testi va dispersiya tahlili (ANOVA) yordamida baholandi; farqlar $p<0,05$ bo‘lganda statistik ishonchli deb hisoblandi.

Natijalar va ularning muhokamasi

Butun zaharning fibrinolitik faolligi. Fibrin plastinkalari testi g‘urza zaharida fibrinolitik proteazalar mavjudligini tasdiqladi. Butun zahar 50 mkg dozada fibrin substratini faol parchaladi; dozani 25 mkg gacha kamaytirish lizis zonasiga sezilarli ta’sir ko‘rsatmadi (lizis zonalari mos ravishda 324,0 va 341,1 mm^2). Bu ikki doza oralig‘ida ta’sirning to‘yinganligidan dalolat beradi va keyingi tajribalar uchun 50 mkg ni ishchi doza sifatida tanlash imkonini berdi.

Zaharni fraksiyalash va fraksiyalarning tavsifi. Sephacryl S-200 da ajratish natijasida to‘rtta asosiy oqsil piki olindi. L-aminokislota oksidaza faolligi faqat birinchi pikda, BAEE-esteraza va fosfolipaza faolliklari esa asosan ikkinchi pikda aniqlandi. Nativ va denaturatsiyalovchi sharoitlarda o‘tkazilgan elektroforetik tahlil 1-fraksiya asosan yuqori molekulyar massali (60–94 kDa) oqsillardan, 2-fraksiya esa nisbatan tor diapazondagi (14–32 kDa) oqsillardan iboratligini ko‘rsatdi.

Fraksiyalarning fibrinolitik faolligi. Fraksiyalarning fibringa ta'siri butun zahar ta'siridan farq qildi. Eng yuqori fibrinolitik faollik III-1 fraksiyasida (50 mkg) qayd etildi. 2-fraksiya hosil qilgan lizis zonasi ancha kichik bo'ldi, 1-fraksiya esa yuqori molekulyar komponentlardan tashkil topganiga qaramay, fibrinni juda sekin parchaladi. Bu natija fibrinolitik faollikning fraksiyaning molekulyar massasi bilan emas, balki undagi fermentlarning substrat spetsifikligi bilan belgilanishini ko'rsatadi.

Trombolitik faollik. Donor qonidan hosil qilingan tromblarda o'tkazilgan tajribalar zaharning doza va vaqtga bog'liq fibrinolitik faolligini ko'rsatdi. 24 soatlik inkubatsiyada nam tromb massasi nazoratdagi 274,8±5,6 mg dan 500 va 1000 mkg/tromb dozalarda mos ravishda 214,7±2,8 va 190,22±9,15 mg gacha kamaydi, ya'ni massaning pasayishi 21,9 va 30,8 % ni tashkil etdi. Inkubatsiya muddatini 48 soatgacha uzaytirish samarani yanada oshirdi: nazoratdagi 260,9±5,6 mg ga nisbatan 500 mkg/tromb dozada 158,22±4,52 mg (39,4 %), 1000 mkg/tromb dozada esa 120,85±4,95 mg (53,7 %) qayd etildi. Barcha farqlar statistik ishonchli bo'ldi ($p<0,05$). Viperidae oilasi ilonlari zaharida va inson qon plazmasida proteaza ingibitorlari mavjudligiga qaramay, zaharning spontan trombga nisbatan faolligi saqlanib qoldi.

Fibrinogenolitik faollik va substrat spetsifikligi. Superose-12 da ajratilgan fraksiyalarning fibrinogen bilan inkubatsiyasidan keyingi DSN-PAAG tahlili fibrinogenazalar mavjudligini tasdiqladi. Molekulyar massasi ≥76–43 kDa bo'lgan fraksiyalar avvalo fibrinogenning Aα zanjirini parchaladi, Bβ zanjirining degradatsiyasi esa nisbatan sekin kechdi. Aksincha, molekulyar massasi ≤43–25 kDa bo'lgan fraksiyalar asosan Bβ zanjirini gidrolizladi, ya'ni Bβ ≥ Aα spetsifikligini namoyon etdi. Barcha hollarda γ-zanjir ta'sirga uchramay saqlanib qoldi. Parchalanish mahsulotlari spektrining fraksiyalar bo'yicha farq qilishi zahar tarkibida kamida ikki xil substrat spetsifikligiga ega fibrinogenazalar mavjudligini ko'rsatadi. Bu xulosa Vipera lebetina zaharidan ajratilgan arginin-esteraza–Bβ-fibrinogenaza bo'yicha ma'lumotlar bilan mos keladi: ushbu ferment (25 mkg/ml) fibrinogen bilan inkubatsiya qilinganda Bβ zanjir 5 daqiqa ichida yo'qolgan, Aα zanjir keyinroq gidrolizlangan, γ zanjir esa 21 soatlik inkubatsiyadan keyin ham saqlangan [10].

Gemorragik faollik va fraksiyani tanlash. Fraksiyalarning gemorragik faolligini dastlabki baholash maksimal gemorragik ta'sir 1-fraksiyada, minimal ta'sir esa 4-fraksiyada kuzatilishini ko'rsatdi. III-1 fraksiyasi yuqori fibrinolitik faollikni nisbatan past gemorragik faollik bilan birlashtirdi. Trombolitik preparat yaratishda aynan shu nisbat hal qiluvchi ahamiyatga ega, chunki ilon zahari metalloproteinazalarining amaliy qo'llanishini cheklovchi asosiy omil ularning gemorragik ta'siri hisoblanadi [2, 3]. Shu sababli III-1 fraksiyasi gemorragik bo'lmagan fibrinogenazalarni ajratish va tavsiflash uchun boshlang'ich material sifatida tanlandi.

Xulosa

1. G'urza (Vipera lebetina turanica) zahari Sephacryl S-200 va Superose-12 gel-filtratsiyasi yordamida fraksiyalarga ajratildi; olingan fraksiyalar molekulyar massasi va fermentativ xususiyatlari bo'yicha sezilarli farq qiladi.

2. Butun zahar fibrin plastinkalarida yuqori fibrinolitik faollik namoyon etdi (50 va 25 mkg dozalarda lizis zonalari mos ravishda 324,0 va 341,1 mm^2).

3. Zahar donor qonidan hosil qilingan trombga doza va vaqtga bog'liq ta'sir ko'rsatdi: 48 soatlik inkubatsiyada 1000 mkg/tromb dozada nam tromb massasi 53,7 % ga kamaydi ($p<0,05$).

4. Zahar tarkibida substrat spetsifikligi bilan farqlanuvchi kamida ikki guruh fibrinogenaza mavjud: ≥76–43 kDa fraksiyalar avvalo Aα zanjirni, ≤43–25 kDa fraksiyalar esa asosan Bβ zanjirni parchalaydi; γ-zanjir barqaror qoladi.

5. Sephacryl S-200 orqali olingan III-1 fraksiyasi yuqori fibrinolitik va nisbatan past gemorragik faollikni birlashtirgani sababli gemorragik bo‘lmagan fibrinogenazalarni ajratish va trombolitik vositalar yaratish uchun istiqbolli boshlang‘ich material hisoblanadi.

Foydalanilgan adabiyotlar

1. Markland F.S. Snake venoms and the hemostatic system // Toxicon. – 1998. – Vol. 36, № 12. – P. 1749–1800. https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00126-3
2. Gutiérrez J.M., Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage // Biochimie. – 2000. – Vol. 82, № 9–10. – P. 841–850. https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01163-9
3. Fox J.W., Serrano S.M.T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases // Toxicon. – 2005. – Vol. 45, № 8. – P. 969–985. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.012
4. Kini R.M. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms // Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis. – 2005. – Vol. 34, № 4–5. – P. 200–204. https://doi.org/10.1159/000092424
5. Swenson S., Markland F.S. Jr. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes // Toxicon. – 2005. – Vol. 45, № 8. – P. 1021–1039. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.027
6. Siigur E., Siigur J. Purification and characterization of lebetase, a fibrinolytic enzyme from Vipera lebetina (snake) venom // Biochimica et Biophysica Acta. – 1991. – Vol. 1074, № 2. – P. 223–229. https://doi.org/10.1016/0304-4165(91)90156-B
7. Siigur J., Samel M., Tõnismägi K., et al. Biochemical characterization of lebetase, a direct-acting fibrinolytic enzyme from Vipera lebetina snake venom // Thrombosis Research. – 1998. – Vol. 90, № 1. – P. 39–49. https://doi.org/10.1016/S0049-3848(98)00009-7
8. Trummal K., Vija H., Subbi J., Siigur J. MALDI-TOF mass spectrometry analysis of substrate specificity of lebetase, a direct-acting fibrinolytic metalloproteinase from Vipera lebetina snake venom // Biochimica et Biophysica Acta. – 2000. – Vol. 1476, № 2. – P. 331–336. https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00236-8
9. Cesarman-Maus G., Hajjar K.A. Molecular mechanisms of fibrinolysis // British Journal of Haematology. – 2005. – Vol. 129, № 3. – P. 307–321. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05444.x
10. Gasmi A., Chabchoub A., Guermazi S., et al. Purification, characterization and evaluation of the thrombolytic activity of a fibrinogenase isolated from Vipera lebetina venom // Archives de l’Institut Pasteur de Tunis. – 1994. – Vol. 71, № 3–4. – P. 483–486.
11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680–685. https://doi.org/10.1038/227680a0