

ՀՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
Լ.Ա. ՕՐԲԵԼՈՒ ԱՆՎԱՆ ՖԻԶԻՈԼՈԳԻԱՅԻ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՂՈՒԼԻԿՅԱՆ ԼՈՒՍԻՆԵ ԱԼՄԻՐԻ

**MACROVIPERA LEBETINA OBTUSA ՕՁԻ ԹՈՒՅՆԻ ՊՐՈՏԵԿՏՈՐԱՅԻՆ
ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՄԵԽԱՆԻԶՄՆԵՐԸ ԿՐՈԿԵՐԻ ՍԱՐԿՈՄԱՅԻ ԵՎ
ԱԼՑՇԵՅՄԵՐԻ ՀԻՎԱՆԴՈՒԹՅԱՆ ԿԵՆԴԱՆԱԿԱՆ ՄՈԴԵԼՆԵՐԻ ՎՐԱ**

Գ.00.09 – «Մարդու և կենդանիների ֆիզիոլոգիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի
հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2017

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ ИМ. Л.А. ОРБЕЛИ

ГУЛИКЯН ЛУСИНЭ АЛМИРОВНА

**ПРОТЕКТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ ЗМЕИНОГО ЯДА *MACROVIPERA
LEBETINA OBTUSA* НА ЖИВОТНЫЕ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА И
САРКОМЫ КРОКЕРА**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.00.09 - «Физиология человека и животных»

Ереван - 2017

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան Ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտի գիտական խորհրդում:

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

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր
Վ.Ա. Չավուշյան-Պապյան
կենս. գիտ թեկ. Մ.Վ. Պողոսյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Մ. Հերացու անվան Երևանի Պետական
Բժշկական Համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2017թ. ապրիլի 4-ին ժամը 14⁰⁰-ին ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան Ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտում, Ֆիզիոլոգիայի 023 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0028, Երևան, Օրբելի եղբ. փող. 22):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան Ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտի գրադարանում և www.physiol.sci.am կայքում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքվել է 2017թ. մարտի 3-ին:

023 մասնագիտական խորհրդի
Գիտական քարտուղար



կ.գ.թ. Ն. Է. Թադևոսյան

Тема диссертации утверждена на заседании Ученого Совета Института физиологии им. Л. А. Орбели НАН РА.

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

Официальные оппоненты: доктор биол. наук В.А. Чавушян-Папян
кандидат биол. наук М. В. Погосян

Ведущая организация: Ереванский Государственный медицинский университет им. М. Гераци

Защита диссертации состоится 4-ого апреля 2017г. в 14⁰⁰ часов, на заседании Специализированного совета 023 по Физиологии, в Институте физиологии им. Л.А. Орбели НАН РА (0028, г. Ереван, ул. Бр. Орбели 22).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии им. Л.А. Орбели НАН РА и на сайте www.physiol.sci.am.

Автореферат разослан 3-го марта 2017г.

Ученый секретарь Спец. Совета 023



к.б.н. Н.Э. Тадевосян

Թեմայի արդիականությունը: Օձի թույներն եղել են և շարունակում են մնալ կենդանական աշխարհի առավել ինտենսիվ հետազոտվող տոքսինները: Որպես դեղամիջոց՝ օձի թույնը լայնորեն կիրառվել է ինչպես ավանդական արևելյան, այնպես էլ՝ չինական բժշկության մեջ: Ժամանակակից բժշկությունում օձի թույնն օգտագործվում է որպես ցավազրկող և հակաբորբոքային միջոց ծայրամասային նյարդային համակարգի հիվանդությունների դեպքում: Կորբայի թույնից անջատված հիմնական գործող բաղադրիչը՝ կոբրոտոքսինը ունի ցավազրկող և հանգստացնող ազդեցություն, օրինակ՝ սրտի անոթների սպազմների, բրոնխիալ ասթմայի, չարորակ ուռուցքների ժամանակ (Steeg P.S., 2010):

Պետք է նշել, որ օձերի թույնի մեջ կենսաբանական սուբստրատի հետ փոխազդեցության ժամանակ բարձր ընտրողականությամբ օժտված առաջնային կառուցվածքով միմյանց նման նյութերի առկայությունը դարձնում է թույնը հիանալի կենսատեխնոլոգիական գործիք ֆիզիոլոգիական պրոցեսների կառուցվածքա-ֆունկցիոնալ ասպեկտները ուսումնասիրելու համար (Qian B. & Pollard J., 2010):

Վերջին տարիների ուսումնասիրությունները ավելի ակնառու են դարձրել օձերի, մասնավորապես՝ իժերի, թունագեղձերի պրոտեոմային և տրանսկրիպտոմային համեմատական վերլուծությունների անցկացման անհրաժեշտությունը (Sanz *et al.*, 2008): Տրանսկրիպտոմային հետազոտություններն իրենցից ներկայացնում են օձերի թունագեղձերում սինթեզվող մասնակի և ամբողջական շղթայով տրանսկրիպտոմների կատալոգ: Այսպիսի տվյալները սակավաթիվ են, սակայն արդեն իսկ բավական շատ են ենթադրություններն այն մասին, որ թույնում առկա պեպտիդները մինչ հայտնի տոքսինների վերածվելը, ենթարկվում են մի ամբողջական կասկադային հետտրանսլյացիոն փոփոխությունների:

Օձերի թույնի վերը նշված և բազմաթիվ այլ առանձնահատկությունները դարձնում են այն ուսումնասիրման բավականին հետաքրքիր և հեռանկարային օբյեկտ, որի իրական գիտական արժեքը ակնհայտորեն կաճի թույնի բաղադրությունում առկա կենսաբանորեն ակտիվ նյութերի նոր յուրօրինակ հատկությունների բացահայտման հետ համատեղ:

Ուսումնասիրության նպատակն ու խնդիրները:

Ներկայացվող հետազոտության նպատակն է հանդիսացել բազմակողմանի ուսումնասիրել դեղաբանական ակտիվ նյութեր պարունակող կովկասյան գյուրգայի թույնի (*Macrovipera lebetina obtusa*, MLO), ինչպես նաև նրա առանձին բաղադրիչների դերը և կիրառումն որոշ պաթոլոգիաների՝ նեյրոդեգեներատիվ (Ալցհեյմերի հիվանդություն) և օնկոլոգիական (Կրոկերի սարկոմա), հնարավոր բուժման գործընթացում: Գնահատել թույնի բաղադրիչների սիներգիկ փոխազդեցության աստիճանը վերջինիս բազմաթիվ ֆունկցիաների, այդ թվում նյարդապաշտպան ազդեցության իրականացման ընթացքում: Առավելագույն

չափով հետազոտել թույնի ազդման մոլեկուլային մեխանիզմներն, որոնց շնորհիվ դիտվում է դրական փոփոխություն նշված հիվանդությունների կլինիկական պատկերում:

Հետազոտության նպատակի իրականացման համար սահմանվել են հետևյալ խնդիրները.

1. Ուսումնասիրել կովկասյան գյուրզայի թույնի ազդեցությունը հիպոկամպի բջիջների մորֆոֆունկցիոնալ և էլեկտրաֆիզիոլոգիական ցուցանիշների վրա Ալցհեյմերի հիվանդության ամիլոիդային մոդելում:
2. Ուսումնասիրել կովկասյան գյուրզայի թույնի հակաօքսիդիչ ազդեցությունը նաև այլ օրգան համակարգերի վիճակի վրա Ալցհեյմերի հիվանդության ամիլոիդային մոդելում:
3. Գնահատել կովկասյան գյուրզայի թույնի և օբտուսատինի՝ S-180 սարկոմայի վրա ունեցած հակաուռուցքային ազդեցությունը:
4. Բացահայտել կովկասյան գյուրզայի թույնի և օբտուսատինի կապվելու ունակությունը S-180 ուռուցքի բջիջների գենոմային ԴՆԹ-ի հետ և ազդեցությունը վերջինիս էլեկտրաֆորետիկ շարժունակության վրա:
5. Որոշել ուռուցքակիր հյուսվածքում կովկասյան գյուրզայի թույնի և օբտուսատինի *in vivo* ազդեցությունը լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացման աստիճանի և հակաօքսիդանտային ֆերմենտային համակարգի բաղադրիչների ակտիվության վրա:

Աշխատանքի գիտական նորոյթն ու գիտագործնական նշանակությունը:

Տվյալ հետազոտություններում թույնի ներմկանային և Aβ ներուղեղփորոքային ներարկման միջոցով սկիզբ է դրվում մի շարք կասկադային պրոցեսների ձևավորմանը: Իսկ օձի թույնով 10 րոպե մշակումը բերում է խայթոցից նույնիսկ բավականին հեռու գտնվող հյուսվածքների որոշակի փոխակերպմանը: Սրանով էլ արտահայտվում է կենդանի օրգանիզմներում թույնի արագ տարածումն, որի համար պատասխանատու են ոչ միայն թույնի բաղադրամասերն, այլ դրանց հյուսվածքների հետ փոխազդեցության երկրորդային պրոդուկտները (լիզոֆոսֆոլիպիդներ և այլն): Նմանատիպ միջնորդված ազդեցության մեխանիզմների ուսումնասիրությունն ակնհայտ հետաքրքրություն է ներկայացնում այսպես կոչված “spreading” էֆեկտի և սիներգիզմի տեսության բնագավառում հիմնարար պարզաբանումներ կատարելու համար:

Մեր ուսումնասիրություններն ունեն նաև ուղղակի կիրառական նշանակություն, քանի որ վկայում են, որ օձի թույնում առկա սպիտակուցներն ունեն դրական ազդեցություն ինչպես արագ զարգացող քաղցկեղների տարբեր տիպերի (մասնավորապես՝ սարկոմաների), այնպես էլ բազմաթիվ այլ (մասնավորապես՝ նեյրոդեգեներատիվ, օրինակ՝ Ալցհեյմերի հիվանդությունը)

հիվանդությունների կասեցման գործում: Այս սպիտակուցներից շատերն այսօր կարող են դառնալ դեղագործության նոր, ժամանակակից ուղղության զգալի մաս: Այսպիսով, նշված հետազոտությունն ակնհայտ գիտագործնական արժեք է ներկայացնում, այն է՝ Հայաստանի էնդեմիկ հերպետոֆաունային յուրահատուկ կենսաբանական ակտիվ նյութերի հնարավոր հակաուռուցքային և հականեյրոդեգեներատիվ հատկությունների բացահայտումը:

Պաշտպանության ներկայացվող հիմնական դրույթներն են.

1. Ե՛վ օբտուսատիոնը, և՛ կովկասյան գյուրզայի թույնն օժտված են հակաուռուցքային ազդեցությամբ և կարող են ճնշել Կրոկերի սարկոմայի աճն ուռուցքակիր մկների մոտ:
2. Ե՛վ օբտուսատիոնը, և՛ կովկասյան գյուրզայի թույնի բաղադրամասի որոշ տարրեր ունակ են կապվելու S-180 սարկոմայի բջիջների գենոմային ԴՆԹ-ի հետ, ինչը կարող է ճնշել որոշ գենների էքսպրեսիան:
3. *In vivo* մշակման ժամանակ օբտուսատիոնը և կովկասյան գյուրզայի թույնը ցուցաբերում են հակաօքսիդանտային հատկություններ Կրոկերի սարկոմայի դեպքում:
4. Կովկասյան գյուրզայի թույնն օժտված է ախտադեղագործական ակտիվությամբ և կարող է ցուցաբերել նյարդապաշտպան հատկություններ Ալցհեյմերի հիվանդության ամիլոիդային մոդելում:

Աշխատանքի փորձարկումը և հրապարակումները:

Ատենախոսության արդյունքները ներկայացվել են տարբեր սեմինարներում և միջազգային գիտաժողովներում: Հրատարակված են թեմայի հետ առնչվող 18 աշխատանք, որոնցից 9 հոդված և 9 թեզիս:

Ատենախոսության կառուցվածքը և ծավալը: Ատենախոսության ծավալը կազմում է 105 էջ: Այն բաղկացած է հետևյալ գլուխներից՝ ներածությունից, գրական ակնարկից (Գլուխ 1), փորձարարական մասից (Գլուխ 2), արդյունքներից և դրանց քննարկումից (Գլուխ 3), ամփոփումից, եզրակացություններից, օգտագործված գրականության ցանկից (ընդհանուր 177 աղբյուր), 1 աղյուսակից և 20 նկարից:

ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ ԵՎ ՆՅՈՒԹԵՐԸ

2.1 Ալցիեյմերի հիվանդության կենդանական մոդելի ստացումը

Ալցիեյմերի հիվանդության կենդանական մոդելի ստացումը նկարագրված է Մորիսի աշխատանքում (Maurice *et al.* 1996): Ուսումնասիրության համար օգտագործվել է կենդանիների 5 խումբ:

1. Առնետներ, որոնց չի ներարկվել $A\beta_{25-35}$ ամիլոիդ (Sigma-Aldrich) և, *MLO* թույն (ինտակտ առնետներ):
2. Առնետներ, որոնց ներարկվել է $A\beta_{25-35}$ ամիլոիդ ներուղեղփորոքային ճանապարհով, ինչպես նաև ներարկվել է ստերիլ թորած ջուր (յուրաքանչյուրին 0,5 մլ) ներմկանային եղանակով (ԱՀ առնետներ):
3. Առնետներ, որոնց գլխուղեղի լատերալ փորոք ներարկվել է $A\beta_{25-35}$ ամիլոիդ ներուղեղփորոքային ճանապարհով, ինչպես նաև ներմկանային եղանակով ներարկվել է *MLO* թույն (LD50 չափաբաժնի 5%-անոց լուծույթ 0,5 մլ) յուրաքանչյուր կենդանուն 7 անգամ (յուրաքանչյուրին 0,5 մլ)՝ 1 օր ընդմիջումով: Նախկինում նաև ցույց է տրվել մկան համար անհրաժեշտ *MLO* թույնի LD50-ի քանակը ներերակային ճանապարհով (18.471.4 մկգ) (Kurtovic *et al.*, 2014):
4. Առնետներ, որոնց ներուղեղփորոքային ճանապարհով ներարկվել է թորած ջուր, ինչպես նաև ներմկանային եղանակով ներարկվել է *MLO* թույն (LD50 չափաբաժնի 5%-անոց լուծույթ 0,5 մլ) յուրաքանչյուր կենդանուն 7 անգամ՝ 1 օր ընդմիջումով:
5. Առնետներ, որոնց ներուղեղփորոքային ճանապարհով ներարկվել է թորած ջուր (ստուգիչ), ինչպես նաև ներմկանային եղանակով ներարկվել է ստերիլ թորած ջուր յուրաքանչյուր կենդանուն 7 անգամ (յուրաքանչյուրին 0,5 մլ)՝ 1 օր ընդմիջումով:

2.2 Հիպոկամպի նեյրոնների էլեկտրաֆիզիոլոգիական ուսումնասիրությունը

Կենդանիները անզգայացվել են ուրետանով (1.2 գ/կգ), անշարժացվել են 1%-անոց դիթիլինով (25 մգ/կգ, ն/փ) և տեղափոխվել են արհեստական շնչառության փուլ: Ողնուղեղը (կրծքային T2-T3 հատվածներ) հատվել է տեղային նոժովկայինային անզգայացման պայմաններում: Դրող էլեկտրոդը ներմուծվել է իպսիլատերալ էնտորինալ կեղևի մեջ հետևյալ ստերեոտաքսիկ կոորդինատներով՝ AP – 9, L ± 3.5 , DV +4.0 մմ, իսկ գրանցող ապակյա 1 մկմ ծայրով միկրոէլեկտրոդը, որը լցված է 2 M NaCl-ի լուծույթով, բազմակի իջեցվել է հիպոկամպի մեջ AP–3.2-3.5; L ± 1.5 -3.5; DV +2.8–4.0 մմ կոորդինատներով:

2.3 Հիստոքիմիական անալիզ

Հիստոքիմիական անալիզն իրականացվել է ըստ Մելիքսթեյանի կողմից մշակված մոտեցման (Yenkoyan *et al.* 2011), համաձայն որի որոշվում է Ca^{2+} -կախյալ թթու ֆոսֆատազի ակտիվությունը: Այս մեթոդը Չիլինգարյանի մեթոդի

(Chilingaryan *et al* 2006) փոփոխված տարբերակն է: Չիլինգարյանի մեթոդի հիմքում ընկած է կալցիումի իոնների՝ անօրգանական ֆոսֆատն իրենց կապելու ունակությունը:

2.4 Սարկոմա S-180 կենդանական մոդելի ստացումը

Սարկոմայի բջիջները ներարկվել են ներմաշկային եղանակով մկների աջ թևի տակ: Երբ ուռուցքի մեծությունը հասել է 100-300 մմ³, առանձնյակները բաժանվել են 3 խմբի (5-ական մուկ). ուռուցքի ստուգիչ խումբ, որին ներարկվել է PBS, օբտուսատախինով մշակվող խումբ, *MLO* օձի թույնով մշակվող խումբ:

Երկրորդ մշակվող խմբին ներարկվել է 1 մգ/կգ չափաբաժնով օբտուսատախին, որը լուծվել է PBS-ի մեջ, և 5 օրվա ընթացքում (50 մկգ) ներարկվել մկներին, իսկ երրորդ խմբին՝ 10 մկգ/մուկ չափաբաժնով *MLO* թույն (Marcinkiewicz *et al* 2003): Վերջին ներարկումից 24 ժամ անց բոլոր մկները կշռվել են և սպանվել գլխատման միջոցով:

2.5 Ուռուցքի հիստոլոգիական ուսումնասիրումը և *in vivo* հակաուռուցքային ակտիվության գնահատումը

Ուսումնասիրություններն անց են կացվել էպիֆյուորեսցենտային տրինոկուլյար մանրադիտակի միջոցով (AmScope, USA):

Հակաուռուցքային ակտիվությունը գնահատվել է հետևյալ բանաձևի միջոցով.

$$T_A = [(A-B)/A]*100\%$$

Որտեղ՝

T_A – հակաուռուցքային ակտիվությունն է,

A-ն ստուգիչ խմբում ուռուցքի միջին քաշն է,

B-ն՝ ուռուցքի միջին քաշն է փորձարկվող խմբում:

2.6 ԴՆԹ-ի շարժունակության որոշումը էլեկտրաֆորեզի միջոցով

ԴՆԹ-ի շարժունակության որոշման անալիզն անց է կացվել, որպեսզի գնահատվի օբտուսատախինի և *MLO* օձի թույնի կապվելու ընդունակությունը գենոմային ԴՆԹ-ի հետ (Wang *et al.* 2012): Գենոմային ԴՆԹ-ն առանձնացվել է S-180 սարկոմայի բջիջներից (precllys tissue DNA kit, PeQlab, Germany): Այնուհետև սպեկտրաֆոտոմետրիկ եղանակով որոշվել է ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիան (Eppendorf BioPhotometer plus, Germany): Հավասար քանակությամբ ԴՆԹ-ն և օբտուսատախինը 30 րոպեների ընթացքում իրար խառնելուց հետո, ստացված ԴՆԹ – օբտուսատախին խառնուրդն էլեկտրաֆորեզիկ եղանակով անց է կացվել 1%-անոց ագարոզային գելի միջով (PerfectBlue™ Horizontal Mini Gel System, PeQlab, Germany): ԴՆԹ-ի անցումը դիտարկվել է ուլտրամանուշակագույն լույսի տակ (illuminator E-BOX VX2-VILBER LOURMAT, PeQlab, Germany):

2.7 Քիմյումինեսցենսային վերլուծություն

Թթվածնի ակտիվ ձևերի քանակությունն որոշվել է քեմիյումինեսցենսային անալիզի միջոցով: Հյուսվածքային հոմոգենատների գերթույլ լուսարձակման ինտենսիվությունը չափվել է քվանտոմետրիկ սարքում, որն իրենից ներկայացնում է գերարագ ֆոտոնային հաշվիչ, 380-630 նմ սպեկտրալ զգայունությամբ: Քիմյումինեսցենսային անալիզի այս սարքը չափազանց զգայուն է և ունակ է գրանցել նույնիսկ 10-15 Վտ ճառագայթվող էներգիա (BERTHOLD Technologies, Germany):

2.8 Լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացման որոշում

Լիպիդային գերօքսիդները կայուն չեն, և առանձնանում են կապերի բարդ սերիայով: Առավել հայտնի է մալոնային երկալդեհիդը (ՄԵԱ): ՄԵԱ-ի մակարդակը որոշվել է սպեկտրաֆոտոմետրիկ չափումներով (Stalnaja and Garishvili, 1985): Լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացման (ԼԳՕ) ինտենսիվությունն որոշվել է թիոբարբիտուրային թթվի (ԹԲԹ) հետ փոխազդող արգասիքների կուտակմամբ (Զաքարյան Ա. Ե. և այլք 2003): Մեթոդի հիմքում ընկած է ՄԵԱ-ի և ԹԲԹ-ի միջև ընթացող ռեակցիան, որը բարձր ջերմաստիճանի (100°C) և pH-ի թթվային արժեքների դեպքում ընթանում է գունավորված եռմեթիլային կոմպլեքսի առաջացմամբ, որը պարունակում է 1 մոլեկուլ ՄԵԱ, 2 մոլեկուլ ԹԲԹ: Առաջացած կոմպլեքսը կլանում է 532 նմ ալիքի երկարությունում: Չափումները կատարվել են CT- 2600 սպեկտրաֆոտոմետրի միջոցով (CT-ChromTech, Taiwan):

2.9 Սուպերօքսիդի սմուտագի ակտիվության սպեկտրաֆոտոմետրիկ որոշումը ադրենալինի միջոցով

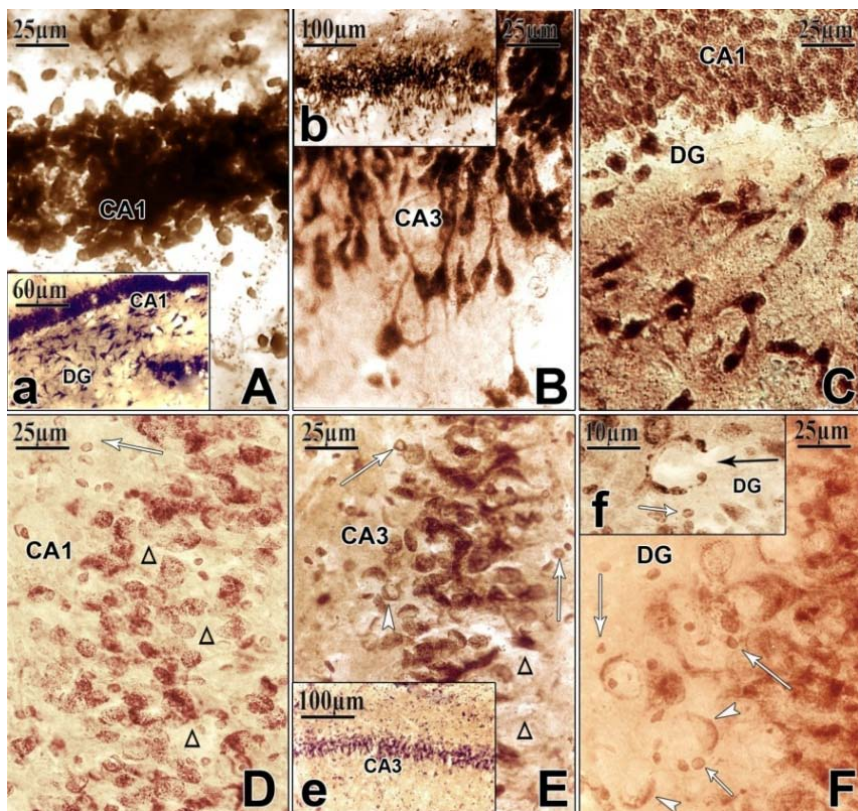
Սուպերօքսիդի սմուտագի (ՍՕԴ) ակտիվությունն որոշվել է օգտագործելով մեթոդը, որի հիմքում ընկած է ադրենալինի ինքնաօքսիդացման ռեակցիայի արգելակման ունակությունը $\text{pH} = 10.2$: Թթվածնի անիոն ռադիկալի առկայությամբ ադրենալինը օքսիդանում է՝ առաջացնելով ադրենոքրոմ (Զաքարյան Ա. Ե. և այլք 2003): Ադրենոքրոմի կոնցենտրացիան որոշվել է 480 նմ-ում՝ օգտագործելով CT-2600 սպեկտրաֆոտոմետրը (CT-ChromTech, Taiwan): Սպիտակուցի կոնցենտրացիան որոշվել է Լոուրիի մեթոդի միջոցով (Lowry, O. H *et al* 1951):

2.10 Վիճակագրական վերլուծություն

Քիմյումինեսցենսային անալիզի, ԼԳՕ ինտենսիվության և ՍՕԴ-ի ակտիվության տվյալների քանակական վերլուծությունը կատարվել է ըստ Ստյուդենտի t-չափանիշի: Սպիտակուցի քանակի միջին արժեքների միջև առկա տարբերությունների հավաստիությունը գնահատվել է ANOVA թեստի միջոցով: Էլեկտրաֆորեզի արդյունքները մշակվել են "Image J" ծրագրային փաթեթի միջոցով:

**3.1 Առնետի ուղեղի հիպոկամպի մորֆոֆունկցիոնալ վիճակի
ուսումնասիրությունն Ալցհեյմերի հիվանդության ամիլոիդային մոդելում**

Հիպոկամպի CA1 և CA3 դաշտերում և ատամնավոր գալարում ինտակտ առնետների նեյրոնները տեղակայված են շարքով, ունեն շատ բարձր խտություն և ներկման բարձր ու հավասարաչափ ինտենսիվություն: Նրանք բազմանկյունաձև, եռանկյունաձև և օվալաձև են և բնորոշվում են թթու ֆոսֆատազի բարձր ակտիվությամբ: Տարբերակվում են դենդրիտները, հստակորեն տարբերակվում են բազալ դենդրիտները (նկար 1 A-C): Համեմատած առողջ առնետների հիպոկամպի հետ ԱՀ առնետների հիպոկամպի կտրվածքներում (նկար 1 D-F) առկա են նկատելի թիթեղաձև մասնիկներ՝ ամիլոիդային վահանիկներ, ձևափոխվել են սպիտակ և սև նյութերը: Մեծ նեյրոնները ներգրավվել են ատամնավոր գալարում, որը ցրված ձևով է տեղակայված և բնորոշվում է թթու ֆոսֆատազի ցածր ակտիվությամբ: Հիպոկամպի CA1 և CA3 դաշտերում ևս նվազել է ֆոսֆատազային ակտիվությունը: Նույն տեղերում նկատվում է բջջային կառույցների սպունգանման նոսրացում: Մորֆոլոգիական պատկերը հիշեցնում է նյարդային բջիջների մեծ այտուց, որն իրենից ներկայացնում է բջջային պաթոլոգիայի բավականին տարածված տեսակ: Նեյրոններում նկատվում են կառուցվածքային փոփոխություններ՝ նեյրոֆիբրիլային մարմնիկների կորուստ: Մի կողմում բջիջներն ունեն բաց գունավորում, իսկ հաջորդ կողմում նրանք բավականին ուժգին ներկված են: Այս բջիջները նման են սուրճի հատիկների: Հիպոկամպի CA1 դաշտում և ատամնավոր գալարում նկատվում են դեգեներատիվ փոփոխություններ: Ամբողջությամբ բացակայում են ծայրային ճյուղավորման ռեակցիաները: Նեյրոնի դեգեներատիվ գործընթացներն ուղեկցվում են հիպոկամպի CA1, CA3 դաշտերում նեյրոնի ցիտոպլազմայում սպունգանման ավելության վիճակի առաջացմամբ: Հիպոկամպի CA1 դաշտը և ատամնավոր գալարը բնորոշվում են "դատարկ" նեյրոններով:



Նկար 1. Ինֆակտ առնետների հիպոկամպի (A-C) և $A\beta_{25-35}$ ամիլոիդի բիլապերալ ներուղեկորոքային ներարկման դեպքում (D-F) կտրվածքները: Նեյրոնները հիպոկամպի CA1 (A, a, D) և CA3 դաշտերում (B, b, E), ալտամալոր գալարում (DG) (C, F, f): (E, F – կենտրոնական քրոմատոլիդ, սև ցուցասլաք – ծերունական սկավառակ; սպիտակ ցուցասլաք – գլխի կորիզ; եռանկյունաձև հատված – լցված նեյրոնային հատվածներով, ցուցասլաքի գլխիկ – բրգաձև նեյրոնների ճեղքված կորիզներ, կենտրոնական քրոմատոլիդ):

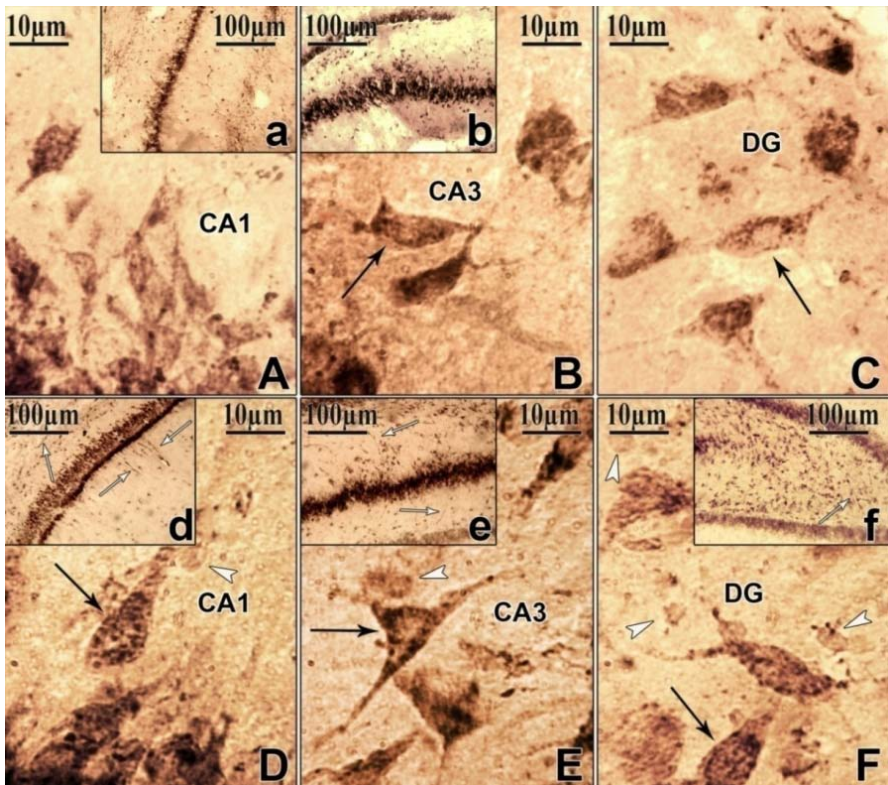
Ատամնավոր գալարի և հիպոկամպի CA3, CA1 դաշտերում առկա են միջբջջային տարածություններ: Նեյրոնների մարմիններն, որոնց մեծամասնությունը ենթարկվել են քրոմատոլիդի, կլորանում են և ուռչում հիպոկամպի CA3 դաշտում, իսկ նեյրոնների կորիզները գրավում են կենտրոնական դիրք: Ատամնավոր գալարի մեծ բրգային բջիջների

էկտոպիկական անհամաչափորեն փքված կորիզները շրջապատված են նստվածքի մուգ շերտով, առկա է ծերունական սկավառակ:

3.2 Կովկասյան գյուրզայի թույնի ազդեցությունը Ալցհեյմերի հիվանդության հիստոլոգիական պատկերի վրա

MLO թույնով մշակումից հետո (նկար 2A-C) վերականգնվում են նորմալ ֆունկցիոնալ վիճակին նպաստող ներքջային կապերը, որը խոսում է թույնի որոշակի նյարդապաշտպան հատկության մասին: *MLO* թույնը վերականգնում է բջիջների չափն ու ձևը, որն էլ ակնհայտորեն բերում է նեյրոնի պլազմատիկ թաղանթի վերականգնմանը: Առկա է ուժեղ կապ մազանոթների և բջիջների միջև, բարձր թթու ֆոսֆատազային ակտիվությամբ նեյրոնները սովորաբար կապվում են միկրոանոթների հետ, մուգ ներկված պերիցիտները տեսանելի են դառնում դրսի պատում: Անոթների աճով է պայմանավորված նաև բջիջների պրոլիֆերացիան և տարբերակումը: Նյարդային բջիջները վերականգնում են իրենց ձևը: *MLO*-ով մշակվող ԱՀ – ի մոդելի արդյունքների ուսումնասիրումը ցույց է տալիս, որ դիտվում են դրական փոփոխություններ նեյրոնների կառուցվածքում, հիպոկամպի դաշտերում նկատվում է նեյրոնների խտության աճ, ակտիվանում է նյութափոխանակությունն, որի շնորհիվ էլ բջիջը կենդանի է մնում: Նկատվում են նոր նյարդային բջիջներ հիպոկամպի CA1 դաշտի դատարկ հատվածներում: Բոլոր դաշտերում բջիջները վերականգնել են իրենց նախկին չափն ու ձևը, կորիզը բջջում գրավել է կենտրոնական դիրք, ցիտոպլազման լցված է նստվածքի հատիկներով, պերիկարիոնը շրջապատվել է տարբեր տիպի հատիկավորմամբ, որը բնորոշ է վերականգնվող նեյրոնների առաջին գրգռմանը: Կա որոշակի տարբերություն նեյրոնների ներկման ինտենսիվության մեջ: Արյան անոթների շուրջ ի հայտ են գալիս որոշակի դենդրիտային և սոմատիկ հավելվածներ, անգիոգենեզը վերականգնվում է:

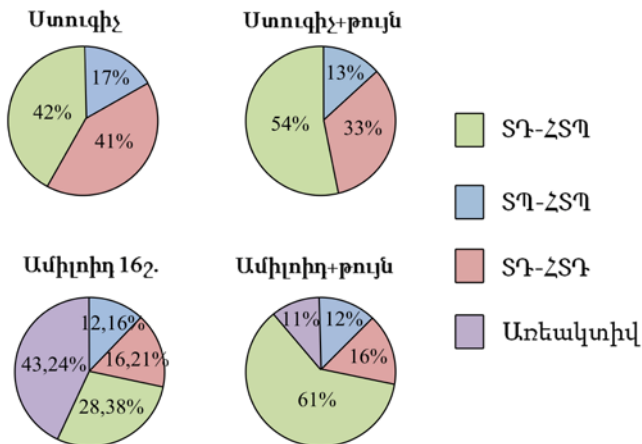
Մեր արդյունքները ցույց են տալիս, որ *MLO* թույնը առողջ՝ ներուղեղփորոքային ճանապարհով թորած ջուր ներարկված կենդանիների հիպոկամպի CA1, CA3 դաշտերում և ատամնավոր գալարի նեյրոնների կառուցվածքային պաթոլոգիկ փոփոխությունների չի բերել (նկար 2 D-F): Հստակ, ինչպես նորմալում, նկատելի են նեյրոնի մարմինը, պերիցիտները, չկան բազալ դենդրիտների կառուցվածքային ճյուղավորման փոփոխություններ: Հստակորեն կարելի է ասել, որ թույնը չունի պաթոլոգիկ ազդեցություններ, ուստի կարելի է այն կիրառել ԱՀ-ի մոդելում՝ հաշվի առնելով նաև մեր կողմից ցույց տրված թույնի հակաօքսիդանտ հատկությունները:



Նկար 2. Բիլաբերալ ներուղեղփորոքային ճանապարհով $A\beta_{25-35}$ ամփոփող ներարկված և MLO թույնով մշակվող առնետների (A-C) և ներուղեղփորոքային ճանապարհով թորած ջուր ու ներմկանային MLO թույն ներարկված առնետների հիպոկամպի կտրվածքները (D-F): Նեյրոնները հիպոկամպի CA1 (A, a, D, d) և CA3 դաշտերում (B, b, E, e), ալամնավոր գալարում (DG) (C, F, f): Նեյրոնի նորմալ մորֆոլոգիայի վերականգնում (A-C), բջջային պատասխանները բացակայում են (a, b, d, f), վերականգնվում են սպիկալ և կողմնային դենդրիտները (A-C), գերսնուցված բջիջները (D-F) օժտված են թթու ֆոսֆատազի բարձր ակտիվությամբ (սև ցուցասլաք - կենտրոնական դիրքում գտնվող կորիզ, սպիտակ ցուցասլաք - արյան անոթներ պերիցիտներով, ցուցասլաքի գլխիկ - սափեղիկային գլխիկ կորիզ):

3.3 Առնետի ուղեղի հիպոկամպի նեյրոնների էլեկտրական ակտիվությունը Ալցհեյմերի հիվանդության ամիլոիդային մոդելում

Համեմատենք առողջ և թույն ներարկված կենդանիների հիպոկամպի նեյրոնների պատասխանների տոկոսային մասնաբաժինը (նկար 3): Թույնի ազդեցությամբ դիտվում է հետտետանիկ պոտենցացիայի աճ (S7-LS7 54%) ի տարբերություն ստուգիչի (S7-LS7 42%), իսկ հետտետանիկ դեպրեսիան նվազում է ստուգիչի համեմատ՝ 41%-ից դառնալով 33%: Ամբողջությամբ բացակայում են առեակտիվ միավորները: Ամիլոիդի ներարկումից հետո ի հայտ են գալիս առեակտիվ միավորները (43%), որոնք բնորոշ են ԱՀ պաթոլոգիային: Սակայն թույնի ավելացումից հետո դիտվում է այս նեյրոնների քանակի զգալի նվազում (11%): Կրկին դիտվում է հետտետանիկ պոտենցացիայի՝ S7-LS7 զգալի աճ՝ 28%-ից մինչև 61%:

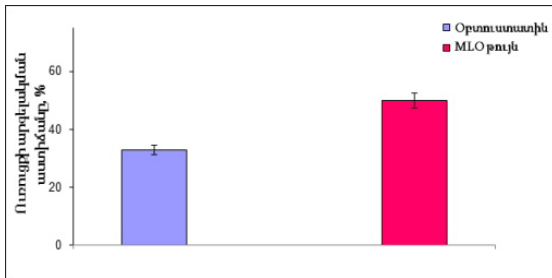


Նկար 3. Պատասխանների տոկոսային մասնաբաժինը

3.4 MLO օծի թույնի և օբտուսատինի ազդեցությունը մկների S-180 ուռուցքի աճի վրա

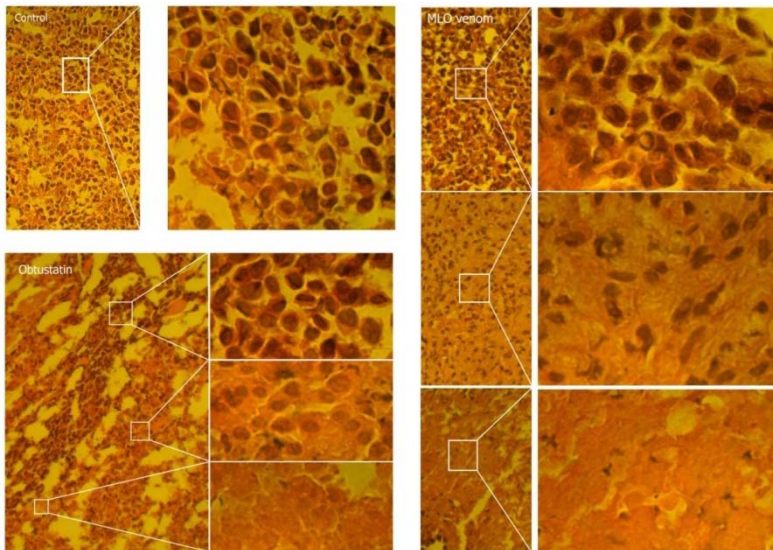
MLO օծի թույնի ազդեցությունը S-180 սարկոմայի վրա ամենահզորն է, համեմատած ստուգիչի և օբտուսատինի հետ: Ընդ որում S-180 սարկոմակիր մկների մարմնի քաշի զգալի փոփոխություն տեղի չի ունեցել, ինչը վկայում է այն մասին, որ ուռուցքի աճը, ինչպես նաև հետագա փոքրացումը պայմանավորված չէր ընդհանուր քաշի անկումով:

Արդյունքները ցույց են տվել, որ MLO օծի թույնը (10 մկգ/մուկ) և օբտուսատինը (50 մկգ/մուկ) զգալիորեն ճնշում են S-180 սարկոմայի աճը համեմատած ստուգիչի հետ, համապատասխանաբար 50 % և 33 % (նկար 4):



Նկար 4. S-180 սարկոմայի աճը ճնշվում է MLO օձի թույնի և օբստատինի ներարկումից հետո ($p < 0.05$):

3.5 MLO օձի թույնի և օբստատինի ազդեցությունը S-180 ուռուցքի հիստոլոգիական պատկերի վրա

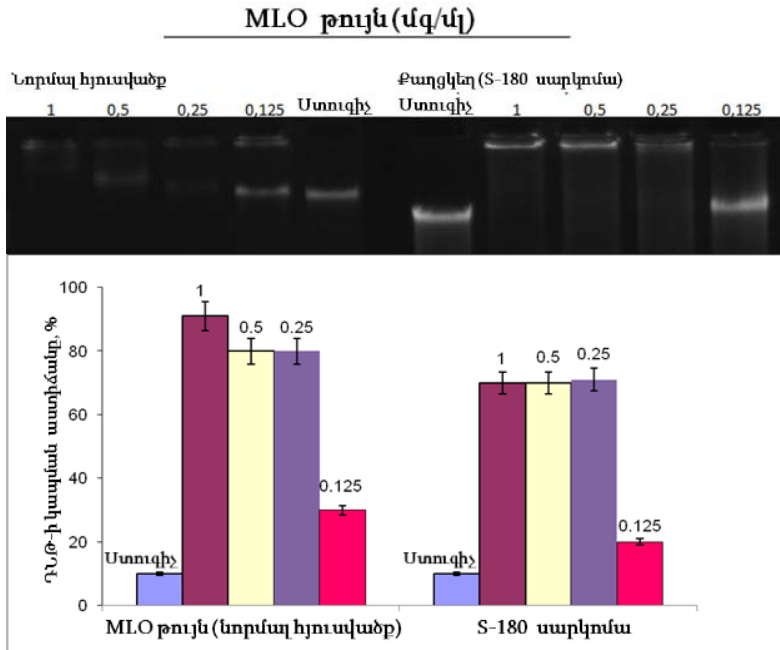


Նկար 5. S-180 սարկոմայի ախտաբանական փոփոխությունները՝ MLO օձի թույն և օբստատինի ներարկելուց հետո ($\times 160$, 640 խոշորացմամբ):

MLO օձի թույն (10 մկգ/մուկ) և օբստատին (50 մկգ/մուկ) ներարկված մկների մոտ (նկար 5) ուռուցքը զգալիորեն ավելի ճնշված է և փոքր, քան ստուգիչ մկների մոտ: Կարևոր է նշել, որ ստուգիչ ուռուցքային նմուշներում բջիջներն ավելի կոմպակտ դասավորություն ունեն, իսկ MLO օձի թույն և օբստատին ներարկվածների մոտ՝ նկատելիորեն անկանոն: Ստուգիչի համեմատությամբ, մյուս երկու խմբերում նկատվում է նաև օջախային նեկրոզներ, նեկրոբիոզ, որն ավելի ցայտուն է արտահայտվում MLO օձի թույն

ներարկված խմբի մոտ: Այն հատվածներում, որտեղ դեռ կան ուռուցքային բջիջներ, նկատվում է կորիզների պոլիմորֆիզմ: *MLO* օձի թույն ներարկված ուռուցքի ակտիվ մասը զգալիորեն ավելի ճնշված է օբտուսատին ներարկված և ստուգիչ խմբերի հետ համեմատած:

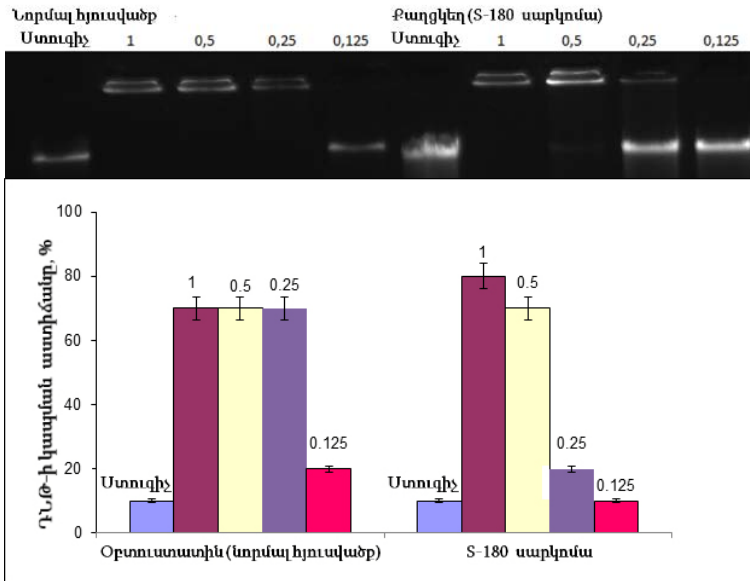
3.6 Օբտուսատինի և *MLO* օձի թույնի կապումը *S-180* սարկոմայի բջիջների գենոմային ԴՆԹ-ի հետ



Նկար 6. *MLO* օձի թույնի ազդեցությամբ *S-180* սարկոմայի բջիջների գենոմային ԴՆԹ-ի էլեկտրաֆորեզիկ շարժունակության անալիզ ($p < 0.05$):

Օբտուսատինը և *MLO* օձի թույնն ունակ են կապվել *S-180* ուռուցքի բջիջների գենոմային ԴՆԹ-ի հետ և արգելակել նրա էլեկտրաֆորեզիկ շարժունակությունը: Թույնի կապումը նորմալ, առողջ հյուսվածքից առանձնացված ԴՆԹ-ի հետ կախված է թույնի կոնցենտրացիայից: Իսկ սարկոմակիր հյուսվածքի դեպքում *MLO* օձի թույնի 3 կոնցենտրացիաներն (1 մգ/մլ, 0.5 մգ/մլ, 0.25 մգ/մլ) ունեն նման ազդեցություն (ԴՆԹ-ի կապումը մոտ 70% է): Սա նշանակում է, որ օձի թույնի կապումը *S-180* սարկոմայի բջիջների գենոմային ԴՆԹ-ի հետ ավելի ուժեղ է քան առողջ հյուսվածքից առանձնացված ԴՆԹ-ի հետ (նկար 6):

Օբտուսատին (մգ/մլ)

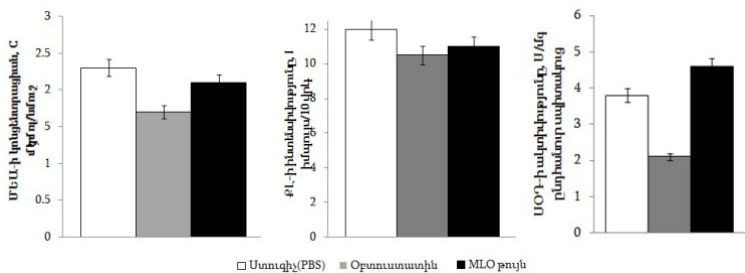


Նկար 7. Օբտուսատինի ազդեցությամբ S-180 սարկոմայի բջիջների գենոմային ԴՆԹ-ի էլեկտրաֆորետիկ շարժունակության անալիզ ($p < 0.05$):

Օբտուսատինի դեպքում (համապատասխան կոնցենտրացիաներով) պատկերը փոխվում է՝ նորմալ հյուսվածքից առանձնացված ԴՆԹ-ի դեպքում օբտուսատինի 3 տարբեր կոնցենտրացիաներ (1 մգ/մլ, 0.5 մգ/մլ, 0.25 մգ/մլ) ունեն նույն ազդեցություն, իսկ ԴՆԹ կապման ցուցանիշը մոտ 70 % է: Ավելի փոքր կոնցենտրացիայի դեպքում (0.125 մգ/մլ) օբտուսատինի կապումը նորմալ հյուսվածքից առանձնացված ԴՆԹ-ի հետ գրեթե չի նկատվում՝ մոտ 20 %: S-180 սարկոմայի բջիջներից առանձնացված ԴՆԹ-ի հետ կապումը 0.25 մգ/մլ և 0.125 մգ/մլ կոնցենտրացիաների դեպքում 20 % և 10 % են համապատասխանաբար: Օբտուսատինի կապումը S-180 սարկոմայի բջիջներից առանձնացված ԴՆԹ-ի հետ ավելի թույլ է, համեմատած *MLO* օձի թույնի: Այսինքն, կարելի է ենթադրել, որ *MLO* օձի թույնի որոշ այլ բաղադրամասեր ևս կապվում են S-180 սարկոմայի գենոմային ԴՆԹ-ի հետ, ինչի շնորհիվ արգելակվում է գենների էքսպրեսիան և դրանով խոչընդոտվում է ուռուցքի հետագա զարգացումը (նկար 7):

3.7 Ազատ ռադիկալային պրոցեսների և դրանց կարգավորող մեխանիզմների աշխատանքի փոփոխությունն օբտուսատինոլ և թույնոլ մշակումից հետո

Հայտնի է, որ օքսիդատիվ սթրեսը քաղցկեղի առաջացման պատճառ է հանդիսանում, իսկ լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացման աստիճանն ինդիկատոր է հանդիսանում օքսիդատիվ սթրեսի համար: Այդ իսկ պատճառով տրամաբանական էր ուսումնասիրել $L\cdot 90$ և $AL\cdot$ պրոցեսների ինտենսիվությունը նաև $S-180$ սարկոմայի դեպքում: Մեր ստացած արդյունքները ցույց են տվել, որ *in vivo* պայմաններում օբտուսատինոլ (1 մգ/կգ) և MLO օձի թույնոլ (10 մկգ/մոլ) մշակված նմուշներում քիմյումինեսցենցիայի ինտենսիվությունը նվազում է ստուգիչի հետ համեմատած (նկար 8):



Նկար 8. Մալոնային երկալդեհիդի քանակության տարբերությունը, սպոնտան քիմյումինեսցենցիայի ինտենսիվության մակարդակը, սուպերօքսիդի համուրազ ֆերմենտի ակտիվության տարբերությունը (ծախից աջ) *in vivo* պայմաններում օբտուսատինոլ և MLO օձի թույնոլ մշակված $S-180$ սարկոմայի հյուսվածքում ($M \pm SEM$, $p < 0.05$):

ՄեԱ-ի քանակը ևս նվազում է *in vivo* պայմաններում օբտուսատինոլ և MLO օձի թույնոլ մշակված նմուշներում, ընդ որում այն ավելի շատ է իջնում օբտուսատինի ազդեցությամբ, քան թույնի (նկար 8): Քիմյումինեսցենտային անալիզի և ADP թեստի արդյունքներն ակնհայտորեն ցույց են տալիս օբտուսատինի և MLO օձի թույնի հակաօքսիդանտային հատկությունը այս պաթոլոգիայի ժամանակ: Ըստ ադրենալինի ինքնօքսիդացման արգելակման բնույթի (լույսի առկայությամբ, բարձր pH-ի դեպքում), օբտուսատինի ազդեցությունից հետո հյուսվածքներում ՍՕԴ ֆերմենտի ակտիվությունը զգալիորեն նվազում է (մոտ երկու անգամ) և նկատելի աճ է ապրում ընդհանուր թույնի մշակումից հետո (նկար 8):

Եզրակացություններ

1. Բացահայտված է, որ և՛ օբտուսատինը, և՛ կովկասյան գյուրզայի թույնը ունեն ակնհայտ հակաուռուցքային ազդեցություն և ճնշում են S-180 սարկոմայի աճն ուռուցքակիր մկների մոտ (33% և 50% համապատասխանաբար ըստ մորֆոմետրիկ վերլուծության):
2. Ցույց է տրված, որ փորձարկվող թույնի բաղադրամասերը բերում են ուռուցքային բջիջների նեկրոզային օջախների առաջացման՝ խափանելով հյուսվածքի չարորակ վերափոխումը:
3. Ցույց է տրված, որ և՛ օբտուսատինը, և՛ *MLO* օձի թույնի բաղադրամասի որոշ այլ տարրեր ունակ են կապվելու S-180 սարկոմայի բջիջների գենոմային ԴՆԹ-ի հետ:
4. Բացահայտված է, որ *in vivo* մշակման ժամանակ օբտուսատինը և *MLO* օձի թույնը ցուցաբերում են հակաօքսիդիչ հատկություններ, ինչը ուղեկցվում է ՍՕԴ ֆերմենտի ակտիվության նվազմամբ՝ օբտուսատինի դեպքում, և աճով՝ թույնով մշակման դեպքում:
5. Կովկասյան գյուրզայի թույնը Ալցհեյմերի հիվանդության կենդանական մոդելում դրական է ազդում հիպոկամպի նեյրոնների կառուցվածքային հատկությունների վրա: Հիպոկամպի CA1 և CA3 դաշտերում պահպանվում է նեյրոնների խտությունն, որն էլ վկայում է բջջների կենսունակ մնալու մասին:
6. Առնետների գլխուղեղի կեղև-հիպոկամպ շղթայի բջջային ակտիվության մակարդակների և տեսակների արտահայտված շեղումներն ամփոփողային մոդելում կանխարգելվում են գյուրզայի թույնի ցածր չափաբաժիններով (LD_{50} -ի 5%-անոց լուծույթ):

Ատենախոսության թեմայով տպագրված աշխատությունների ցուցակ

1. Kirakosyan G. R., Mohamadvarzi M., Ghulikyan L. A., Zaqaryan N. A., Kishmiryan A. V., Ayvazyan N. M.(2016). Morphological and functional alteration of erythrocyte ghosts and giant unilamellar vesicles caused by *Vipera latifi* venom. CBP Part C (190), p. 48-53.
2. Ghulikyan L. A., Mohamadvarzi M., Ghukasyan G. V., Kishmiryan A. V., Zaqaryan N. A., Kirakosyan G. R., Ayvazyan N. M.(2016) Molecular events associated with *Vipera latifi* venom effect on condition of human red blood cells. . Proc. of YSU: Chemistry and Biology N2: p. 43 – 50.
3. N. Ayvazyan, M. Mohamadvarzi, G. Kirakosyan, L. Ghulikyan, N. Zaqaryan (2016) Morphological and functional alteration of human erythrocytes caused by some iranian vipers' venom: novel glance at the old problem. Acta Physiologica, June, 217:42-42.
4. Ghulikyan L. A. (2015) Membranotropic effect of *Montivipera raddei* and *Macrovipera lebetina obtusa* venom with phospholipase A2 inhibited by p-bromophenacyl bromide. Proc. of YSU: Chemistry and Biology N3: p. 47 – 52.
5. Ghazaryan N.A., Ghulikyan L.A., Kishmiryan A.V., Kirakosyan G.R., Nazaryan O.H., Ghevondyan T.H., Zakaryan N.A., Ayvazyan N.M. (2015) Anti-tumor effect investigation of obtustatin and crude *Macrovipera lebetina obtusa* venom in S-180 sarcoma bearing mice. Eur J Pharmacol. 764: p.340-345.
6. Ghazaryan N.A., Ghulikyan L., Kishmiryan A., Andreeva T.V., Utkin Y.N., Tsetlin V.I., Lomonte B., Ayvazyan N.M. (2015) Phospholipases A₂ from *Viperidae* snakes: Differences in membranotropic activity between enzymatically active toxin and its inactive isoforms. BBA - Biomembranes, 1848 (2): p. 463-468.
7. Kazaryan N. A., Gulikyan L., Lomonte B., Andreeva T. V., Tsetlin V. I., Utkin U. N., Aivazyan N. M. (2014) Comparative analysis of membranotropic properties of various phospholipases A₂ from venom of snakes of the family viperidae.// Dokl. Biochemistry and Biophysics, Volume 457, Issue 1, p. 125-127.
8. Ghazaryan N.A., Ghulikyan L.A., Kishmiryan A., Ayvazyan N.M. (2014) Comparative analysis of D49 A₂ and K49 A₂ isolated from *Macrovipera lebetina obtusa* and *Bothrops jararacussu* snake venoms. 8th IUPAP International Conference on Biological Physics, Beijing, China, p. 95.
9. Ghazaryan N.A., Ghulikyan L.A., Ayvazyan N.M., (2013) Morphological changes of proteolipid GUVs affected by *MLO* venom visualized with fluorescence microscope.// Journal of Membrane Biology, 246 (8): p. 627–632.
10. Kirakosyan G., Tadevosyan H., Ghazaryan N., Ghulikyan L., Ayvazyan N. (2014) The effect of *Macrovipera lebetina obtusa* viper venom on erythrocyte ghosts membrane ATPase activities. BBA-Bioenergetics, EBEC, Lisbon,

Portugal, e109-e110.

11. Ghazaryan N.A., Ghulikyan L.A., Tadevosyan H. H., Kirakosyan G. R., Ayvazyan N.M. Studies of membrane structure with fluorescent LAURDAN and PRODAN probes in the course of *Macrovipera lebetina obtusa* venom interaction. //Third Jubilee International Conference of neuroscience and biological psychiatry, Yerevan, Armenia, September 22-24, 2013 p.51.
12. Ghazaryan N.A., Ghulikyan L.A., Tadevosyan H. H., Kirakosyan G. R., Ayvazyan N.M. ANS- containing phospholipid giant unilamellar vesicle deformation under the influence of *Macrovipera lebetina obtusa* venom (PLA₂ inhibited). //Third Jubilee International Conference of neuroscience and biological psychiatry, Yerevan, Armenia, September 22-24, 2013 p.18.
13. Ghazaryan N., Ghulikyan L., Tadevosyan H., Kirakosyan G., Ayvazyan N., Membrane perturbation of erythrocyte ghosts induced by *Macrovipera lebetina obtusa* venom. // 9th European Biophysics Congress, Lisbon, Portugal, July 13th – 17th, 2013, p. 440.
14. **Ghazaryan N.A., Ghulikyan L.A., Ayvazyan N.M., Molecular mechanisms of *Macrovipera lebetina obtusa* venom action on giant unilamellar vesicles from brain proteolipids. //Jubilee Int. Conf. “Physiological mechanisms of organisms functional regulation”, Yerevan, Armenia, October 10-13, 2012 p. 117-121.**
15. Ayvazian N. M., Ghazaryan N. A, Ghulikyan L. A. Lipid Bilayer Condition Abnormalities Following *Macrovipera lebetina obtusa* and *Montivipera raddei* Snake Envenomation. // Toxicon Special Issue: 17th World Congress of the International Society on Toxinology& Venom Week 2012, 4th International Scientific Symposium on All Things Venomous, Honolulu, Hawaii, July 8 - 13, 2012; Volume 60, Number 2, August 2012, p. 167.
16. Ghazaryan N.A., Ghulikyan L.A., Ayvazyan N.M., Giant unilamellar vesicles as an ideal system for the study of interaction with enzymatic components of venom.// Second European Symposium on Microbial Lipids, Microbial Lipids: Diversity in Structure and Function, Bern, Switzerland, May 16-19, 2012, p.49.
17. Ghazaryan N.A., Ghulikyan L.A., Ayvazyan N.M., Molecular mechanisms of GUVs from high density lipoproteins under the influence of *MLO* venom. //11th Int. School of Biophysics, Primosten, Croatia, September 30-October 9, 2012, p. 67.
18. **Ghazaryan N.A., Ghulikyan L.A., Ayvazyan N.M., *Macrovipera lebetina obtusa* venom action on giant unilamellar vesicles from brain proteolipids.// Int. Young Scientists Conf. “Perspectives for development of molecular and cellular biology”, Yerevan, Armenia, Sep 26-29, 2012, p.77-81.**

Резюме

Ключевые слова: *MLO* яд, обтустатин, болезнь Альцгеймера, S-180 саркома.

При болезни Альцгеймера в мозгу наблюдаются следующие патологические процессы: накопление и отложение β -амилоида, активация астроцитов и микроглии, нарушение холинергической нейротрансмиссии. Крысам интрацеребровентрикулярно вводили $A\beta_{25-35}$ амилоид в сочетании с семикратным внутримышечным введением *MLO* яда (5% -ный раствор ЛД50 дозы 0,5 мл/крыса), с интервалом в 1 день. В гиппокампе $A\beta$ индуцированных крыс резко снизилась активность фосфатазы. В CA1 и CA3 полях появилось большое количество поврежденных нейронов. Системное введение малых доз *MLO* яда оказывает положительное влияние на структурные свойства нейронов, повышает обмен веществ и Ca^{2+} -зависимое фосфорилирование, также увеличивает плотность нейронов в CA1 и CA3 полях, что определяет выживаемость клетки. *MLO* яд поднимает уровень реакций тетанических депрессий – посттетанической потенциации после высокочастотной тетанической стимуляции энторинальной коры. После $A\beta$ индуцированной нейродегенерации увеличение количества нейронов гиппокампа может способствовать восстановительным процессам в гиппокампе.

Изолированный из *MLO* яда, обтустатин является самым коротким известным мономерным дезинтегрином змеиного яда и специфическим ингибитором $\alpha\beta 1$ интегрин. Этот пептид имеет потенциальное терапевтическое влияние на прогрессирование меланомы, которое связано с ингибированием ангиогенеза. Для исследования противоопухолевого эффекта *MLO* яда и обтустатина проводились: гистологическое исследование, анализы для определения подвижности ДНК, некоторые биохимические анализы (хемилюминесценция, ТБК-тест) на S-180 моделях мышей. Размер опухоли значительно подавляется под воздействием *MLO* яда (10 мкг/мышь) и обтустатина (50 мкг/мышь): 50 % и 33 % соответственно. Наблюдается также снижение хемилюминесценции, малонового диальдегида, которое сопровождается снижением активности супероксиддисмутазы при воздействии обтустатина и увеличением последнего при обработке ядом.

Таким образом, *MLO* яд и обтустатин могут внести значительный вклад в лечении болезни Альцгеймера и злокачественных опухолей.

Abstract

Keywords: *MLO* venom, obtustatin, Alzheimer's disease, S-180 sarcoma.

The pathological features in Alzheimer's disease brain include the accumulation and deposition of β -amyloid ($A\beta$), activation of astrocytes and microglia and disruption of cholinergic neurotransmission. The rats are injected with $A\beta_{25-35}$ amyloid intracerebroventricular in combination with the intramuscular injection of *MLO* venom (5% solution of LD 50 dose, 0.5 ml, per animal seven times at intervals of 1 day). The phosphatase activity has sharply dropped in the $A\beta$ -induced rats in the hippocampus. The most vulnerable neurons have been in the field of the CA1 and CA3. The results of the study have shown that systemic administration of small doses of viper's *MLO* venom has had positive changes in the structural properties of neurons, increased metabolism, enhanced Ca^{2+} -dependent phosphorylation processes, also the density of neurons were increased in the CA1 and CA3 fields which determines cell survival. *MLO* venom increases the level of TD-PTP responses after high frequency tetanic stimulation of entorhinal cortex. Quantitative increase of hippocampal neurons can contribute to recovery processes after $A\beta$ -induced neurodegeneration in hippocampus.

Isolated from the *MLO* venom, obtustatin represents the shortest known snake venom monomeric disintegrin specific inhibitor of $\alpha 1\beta 1$ integrin. This low molecular weight peptide revealed a potent therapeutic effect on melanoma progression. Its oncostatic effect was related to the inhibition of angiogenesis. For elucidation the influence of obtustatin and crude *MLO* venom were used histological examination, DNA retardation assay and some biochemical tests (ChL, TBA-test) on S-180 sarcoma bearing mouse model. The size of tumor was significantly inhibited by *MLO* venom and obtustatin with the inhibitory rate of 50% and 33% at the doses of 10 μ g/mouse and 1 mg/kg/day respectively. Both ChL and MDA decrease in the two treated groups. Thus, both *MLO* venom and obtustatin can make a significant contribution for the treatment of Alzheimer's disease and malignant sarcoma.